

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-503622

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)4月20日

(51) Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/08		9161-4B	
C 0 7 K 16/00		8318-4H	
16/18		8318-4H	
16/32		8318-4H	
		9050-4B	
		C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求(全 17 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-514437
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)12月10日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)8月11日
 (86) 国際出願番号 PCT/US93/12039
 (87) 国際公開番号 WO94/13806
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)6月23日
 (31) 優先権主張番号 990, 263
 (32) 優先日 1992年12月11日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

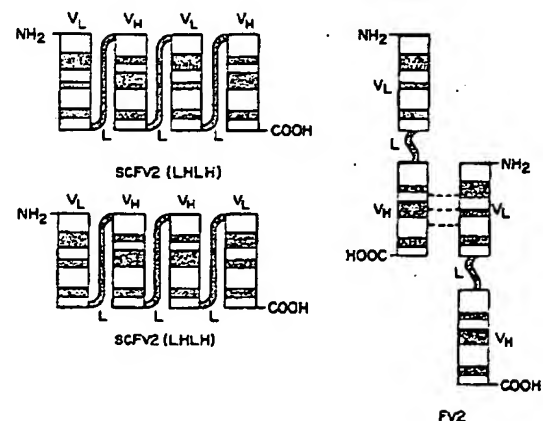
(71) 出願人 ザ ダウ ケミカル カンパニー
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, アボット ロード, ダウ センター 2030
 (72) 発明者 メセス, ビーター エス.
 アメリカ合衆国, コネチカット 06371, オールドライム, シル レーン 25
 (72) 発明者 ゴーリー, ブライアン ビー.
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, オーチャード ドライブ 3713
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

(54) 【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

(57) 【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチドリンカーを用いることによって作った。各一本鎖抗体は、ペプチドリンカーにより、可変重鎖ドメインに連結されている可変軽鎖ドメインを有する。

共有及び非共有結合型一本鎖Fv多量体の図解



特許(内容に変更なし)

請求の範囲

1. 2以上的一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Ala Lys Asp Ala Lys Lys
Asp Leu

を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. この軽鎖可変領域が、図3に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そしてこの重鎖可変領域が、図5に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

5. 多価の一本鎖抗体をコードする DNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2以上的一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

特許(内容に変更なし)

明細書

多価の一本鎖抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に反応して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV_L及びV_Hと称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能を果たす。

アミノ酸配列データは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフラックされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は診

- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、DNA配列。

6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が図3のそれと実質的に同じである、請求項5記載のDNA配列。

断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエロマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にとってのネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に由来する抗体の定常領域と組合せられたものが組換えDNA方法論により作られている。例えば、Sahagenら、J. Immunol., 137: 1066-1074 (1986); Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1987); Nishimuraら、Cancer Res., 47: 899-1005 (1987); 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987)を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その高運動力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を構成するFc領域を保有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、個々の組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管浸透性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV_Lと一本のV_Hとにより一本鎖抗体フラグメント(scFvs)が作られており、これは8つのCDRを含み、それらはペプチドリンカ

一(米国特許第 4,946,778号)により連結された V_L-L-V_L 。ポリペプチドを成しており、ここではペプチドリンカーを要している。 V_L と V_H ドメインが配向 V_L-L-V_L であるscFvが米国特許第 5,132,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の2つの結合部位と比べてscFvは一つのそれを有するため、scFvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、且つその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有するscFvの構築を獲得することが有利であろう。加えて、個々の超分子上の別々のエピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベース増強を可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体増強を可能とする二価特異的である多価scFvを獲得することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本の V_L と一本の V_H ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合親和力を維持している多価一本鎖抗体を形成できうることが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の軽鎖可変ドメインと2本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

図5は CC49V₂ のアミノ酸配列を示す。

図6は p49LHLHにおけるCC49一本鎖抗体LHLHのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図7は p49LHHLにおけるCC49一本鎖抗体LHHLのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSL301T及びpSL301HTの構築を示す。

図9はプラスミド p49LHHLの構築を示す。

図10はプラスミド p49LHLHの構築を示す。

図11はCC49IgG、CC49scFv2及びCC49scFvを用いた、融合因子としてビオチニル化 CC49IgGを用いる融合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に組入れる。

接頭、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらはIUPAC IUB (Commission on Biological Nomenclature) 又は関連分野の實際に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、 V_L-L-V_L により変えられる、ペプチドリンカー(L)により V_H ドメインに連結された V_L ドメインを含むポリペプチドを意味する。 V_L と V_H ドメインとの順序は逆であってよく、 V_H-L-V_L として表わされるポリペプチドが獲得できる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本鎖抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

$V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_L$ ； $V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_L$ ； $V_H-L-V_L-L-V_L-L-V_L$ ；

又は

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA 配列を提供し、ここでこの多価の一本鎖抗体は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管通過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が2種類の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

図面の簡単な説明

図1は、 $V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_L$ (LHLH) と $V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_L$ (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型Pv一本鎖抗体(Pv2)を示す。

図2は CC49V₁ のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49V₁ のアミノ酸配列を示す。

図4は CC49V₂ のヌクレオチド配列を示す。

$V_H-L-V_L-L-V_L-L-V_L$ 。

の V_L と V_H ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチドリンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、 V_L と V_H ドメインの数は等しい。

本発明は、

$V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_L$ 又は $V_L-L-V_L-L-V_H-L-V_L$

で表示されうる多価の一本鎖抗体も提供する。

$V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_L$ (LHLH) 及び $V_L-L-V_L-L-V_H-L-V_L$ (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型Pv一本鎖抗体(Pv2)も図1に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の軽鎖及び/又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA 配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起源が必要とされる。適当な DNA 配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Services により公開された KabatらのSequences of Proteins of Immunological Interest 第4版(1991)は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を開示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする DNA の起

源として、逆転写酵素仲介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起源は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できる。例えば、カタログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Culture Collection, 20309 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990)を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの細胞系及びその他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できよう。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家畜動物とそして最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は腫瘍の抗原であるか、又はハプテンであるとき、キーホールリンベットヘモシアニン(KLE)の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性複合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間隔きの免疫原の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施される。通常、最後の免疫の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できるようにハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する単独細胞へと解離する。腫瘍の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV_H及びV_Lドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開されたPCT出願NO 90/04410及び1988年1月26日に公開されたPCT出願NO 89/00692に開示されている、腫瘍関連タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開NO 90/04410及びNO 89/00692に

する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PantolianoらのBiochem., 30, 10117-10125 (1991)に開示されている205Cと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるXhoI部位と、他端にあるHindIII部位により指定されるコドンで理由に改えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである：

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu。

このリンカーは一般に10〜50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性な種に由来するレプリコンとコントロール配列とを含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌(E. coli)はpBR322を用いて容易に形質転換される(Bolivarら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できよう。S. セレビジェ(S. cerevisiae)又は一般のパン酵母が真核微生物の中で最も

においてCC48と表示されているモノクローナル抗体に由来するV_H及びV_Lドメインである。CC48のV_Hをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図1に示すものと実質的に同じである。CC48のV_Lのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Hをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Lをコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図4に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V_HとV_Lドメインを連結するための適当なリンカーは、V_HとV_Lドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものと構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのV_H及びV_Lドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することで本明細書に記入される米国特許第4,946,778号に開示の方法により獲得できる。この第4,946,778号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できる。

好ましくは、V_HとV_Lドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有

一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばピシアバストリス(Pichia pastoris)が有用である。多細胞生物、例えばATCCより入手できるSP2/O又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できよう。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドはpSV2neo及びpSV2gpt(ATCC)；pSVL及びpKSV-10(Pharmacia)；pBPV-1/pML2d(International Biotechnology, Inc.)である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及び真核ウィルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築物は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び集成過程とつり合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって追加の要素が必要とされる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が集成及び折りたたみを助長するために必要とされる(シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たす

ように簡単に改変されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組換え DNA 技術を用いて構築されたベクターにより超換的に形質転換されうる細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、夾雑微生物が培養地の中で繁殖することを防ぐうえで利用されうる。この態様において、かかる様々な形質転換細胞の培養物は生存のために開発された表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成されうる。例えば、もしそれらが培養地の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は限外濾過により濃縮されうる。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を実行することにより達成されうる。不溶性であり、屈折体 (refractile bodies)、通体封入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を単離するための遠心と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-HCl による可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製できうる。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば競合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 及びラジオイムノアッセイ (RIA) により測定できうる。

IEF	等電点電気泳動
Kbp	キロ塩基対
LB	Luria-Bertani 培地
Mab	モノクローナル抗体
MES	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
MW	分子量
NBT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴヌクレオチド
PAG	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
pSCFV	SCFV をコードする DNA 配列を含むプラスミド
RIGS	ラジオイムノガイド外科
RIT	ラジオイムノ治療
scFv	一本鎖 Fv イムノグロブリンフラグメントモノマー
scFvs	共有結合した一本鎖 Fv イムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
TBS	トリス緩衝食塩水
トリス	(トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン)
TTBS	ツイーン 20 洗浄液
V _H	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V _L	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

抗体

CC49: ヒト腫瘍関連糖タンパク質 72 (TAG-72) に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459 として寄託。

本発明の多価の一本鎖抗体に診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は 1 又は複数の抗体フラグメントが標的組織に対して特異的であるように、及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好都合な薬理組成物も考慮しており、ここでこの標的抗原はしばしば細胞の表面上で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって結合されうる。本発明の薬理組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の混合、溶解又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

略語

BCIP	5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート
bp	塩基対
Bis-Tris	ブロバン (1,3-ビス (トリス (ヒドロキシメチル) -メチルアミノ) ブロバン)
BSA	牛血清アルブミン
CDR	相補性決定領域
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
Fv2	非共有一本鎖 Fv ダイマー

CC49PAB: 重鎖の N-末端領域に連結している完全軽鎖より成る CC49 の抗原結合性領域。

CC49scFv: ペプチドリンカーにより連結されている CC49 抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Fv2: ダイマーを構成するように非共有結合している 2 つの CC49scFv。Fv の後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば CC49Fv6 は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3 つのリンカーにより連結されている、2 本の CC49V_H ドメインと 2 本の V_L ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V_L (L) と V_H (H) ドメインとを連結し合わせるのに 6 つの可能な順序の組合せがある: LHLH, LHHL, LLHH, HLLH, HLHL 及び HHLH。

プラスミド

pSCFV UNH: 25 のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49 の可変重鎖と CC49 可変軽鎖とより成る scFv についてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHLH 又は p49LHHL: CC49scFv2 LHLH 又は LHHL 生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

実施例

一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することによって本明細書に組入れる。Sambrook ら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第 2 版 (1989) 及び Ausubel ら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992) に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び精製

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、標準の β -シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 391 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で8~15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその粗混合物を30~40 μ lの蒸留水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化した。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1mlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのEDTAの中で65℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標) C-18カラム (Millipore, Bedford, MA) に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで溶解させることによって行った。その溶解の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm (OD₂₆₀)での光学密度を測定することにより決定した。

制限酵素消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BW, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをエチジウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを短波UV光により顕微鏡化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ (Union Carbide Corp., Chicago) の中に入れ、そしてMax Submarine電気泳動装置(Hoefer Scientific Instruments,

より測定した。scFv2の結合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の結合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル(20 μ l)を、非還元用サンプル調製バッファSepasol 1(Integrated Separation Systems(ISS), Natick, MA)の中で5分間煮沸することにより調製し、そして10~20%勾配のポリアクリルアミド Daiichi Minigelにその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル当たり55mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをクマジーブリアントブルーR-250 (Bio-Rad, Richmond, CA) の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子量標準品は予め染められており (Mid Range kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼb、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オвалブミン、ラクト脱ヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、B-ラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ95,000、55,000、43,000、36,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュプリケートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を陽極バッファ #1 (0.3Mのトリス-HCl, pH10.4) の中で15~20分平衡にした。Immobilon-P PVDF (ポリビニリデンジクロリン) 膜 (Millipore, Bedford, MA) をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファ #1 の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE 装置 (Millipore) を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一連の陽極バッファ #1 を陽極電極面の中央に載せた。Whatman 3MM 濾紙のシートを陽極バッファ #1 の中に浸し、そしてその電

CA) を用いて溶解させた。サンプル容量を Speed Vac濃縮器 (Savant Instruments, Inc., NY) で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして感水水の中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら, Can. Res., 46, 850-857 (1986)に実質的に記載の通りに調製した TAG-72抗原を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイタープレート (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA) のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200 μ lのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25 μ lの試験抗体及び25 μ lのビオチニル化CC49 (1/20,000希釈率の1mg/mlの溶液) をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合した TAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余計な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる競合を排除するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5 μ g/mlのCC49及び10 μ g/mlのCC49Pabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び又は濃IBとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの結合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50 μ l (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50 μ lのパーニトロフェニルホスフェート溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) を加え、そして発色反応を最低20分行わせた。scFv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA) を用い404~450 nmでの光学密度スキャンニングに

極面の上に滑らかに置いた。陽極バッファ #2 (25mMのトリス, pH10.4) の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に陰極バッファ (40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH9.4) の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mMの定常電圧 (初期電圧は8~20ボルトに範囲した) を用いて30分で進められた。

ブロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング溶液 (トリス緩衝食塩水(TBS) 中の1%の牛血清アルブミン(BSA) (Sigma, St. Louis, MO)) を有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical (Rockford, IL)より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を提供する。これらの膜を最少限1時間、室温でブロックし、そして20mlづつの0.5%のツイーン20洗浄液 (TTBS) を用いて5分間3回洗った。TTBSを調製するには、0.5mlのツイーン20 (Sigma) をTBSのリッター当たり混合した。使用したプローブ抗体は20mlのビオチニル化 FAID 14溶液とした(10 μ g/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTTBS当たり1gのBSAを加えることにより作った。室温で30~60分ブロットした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を室温において30~60分、抗体バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの結合されたストレプトアビジン (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) 20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ (20ml) の中で2分洗った。このバッファは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl₂ · H₂O, pH9.8とした。アルカリホスファターゼにとっ

での基質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Pierceよりウェスタン染色剤として市販されている。染色のため、それぞれ120μlを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで染色液からそれらを水で洗い流した。

ビオチニル化 FAID 14

FAID 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄託されているネズミの抗-イデオタイプ抗体(IgG2a, Kアイソタイプ)である。FAID 14をNygene Protein Aアフィニティーカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製造者のプロトコールに従ったが、ただし溶融バッファーとして0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。画分を1.0Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH~7に中和した。ビオチニル化反応は下記の通りに設定した。FAID 14(1mg、水の中で100μl)を100μlの0.1MのNa₂CO₃、pH 9.6と混合した。ビオチニル-e-アミノ-N-カプロン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mg)を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS 溶液(20μl)をFAID 14溶液に加え、そして22℃で4時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8μl/minの流速で、ビオチニル化FAID 14は16.8minのピークで出現した。このピークを構成する画分をプールし、そして4℃で保存し、そしてCC49V₁及びV₂CDRにより決定

されるCC49イデオタイプを検出するのに用いた。

等電点電気泳動(IEP)

等電点(pI)は、DNASTAR (Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATEという名のコンピュータプログラムを用いて決定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてpI値が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計数は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に關与するからである。

実験的にpIを、Isogelアガロース IEFプレート、pH域3~10(FMC Bioproducts, Rockland, ME)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEFを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEF標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、β-ラクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レンデルレクテン及びチトクロームCを含み、それらのpI値は4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00並びに8.20及び8.60である。ゲルを、FMCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

CC49抗体種の定量

IgG, scFv2の種および単量体scFvを含む精製CC49抗体はすべて、適合している1.0cm光路長の石英型キュベット(Hellma社)およびPerkin-Elmer UV/VIS 分光光度計552A型を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長光の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数(E₁)は、各抗体について、下記式を用いて決定した。

$$E_1 = (\text{Tyr数}) \times 5,500 + (\text{Tyr数}) \times 1,340 + ((\text{Cys} \text{ 2数}) \times 150 + (\text{Phe数}) \times 10)$$

これらの値は、D.B. Watlauber, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375~378頁に記載されている情報に基づいている。

高性能液体クロマトグラフィー

CC49scFv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にチタンまたはテフロン配管を用いたLKB HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型制御器、276nmの吸光度に設定されたUV CORD SII 2238型検出装置および2211型SuperRac fraction collectorで構成されている。

サブユニットのPCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150ピコグラム(pg)のプラスミド標的(pSCFVUHM)：100ピコモルのプライマー：1μlのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウエーク所在)のAmpli-Tagポリメラーゼ；16μlの10mM dNTPおよび10μlの10×緩衝液(両者ともにPECキットに提供されている)；ならびに合計容積を100μlにするのに十分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのほとんど同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー(thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、その1サイクルは、94℃で20~45秒間のDNAの変性；52~60℃で0.5~1.5分間のアニーリングおよび72℃で0.5~2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の3EQ4型もしくは591型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

リゲーション

100ngのベクターDNAおよび対応する1：1化学量論的当量のインサートDNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国、

カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容積20μl)は最初18℃でインキュベートし、次いで一夜4℃まで徐々に冷却した。

形質転換

形質転換は、100μlのStratagene社の大腸菌(E. coli) AG1コンピテント細胞(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA(1~5μl)を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアブロス(LB)中で37℃で1時間再生させ、続いて、pSCFVUHM, p49LHLHもしくはp49LHHLに用いる20μg/mLのクロラムフェニコール含有(CAW20)ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由来のその後の構築物に用いる100μg/mLアンピシリン(AMP100)ルリア寒天プレート(LB-AMP100)上にプレートした。

大腸菌クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、Progene社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のMagicミニプレッププラスミド製造キットを用いて、淘洗圧(selection pressure)を維持するため適切な薬剤を含有するLBブロス培養物から単離した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

プラスミドの構築

p49LHLHおよびp49LHHLと命名された2種のプラスミドを、多価の一本鎖抗体を製造するために構築した。p49LHLHを含有する宿主細胞は、V_H-L-V_H-L-V_H-L-V_Hで表すことができるポリペプチドを産生した。ここでV_HとV_LはCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー(L)は、下記SEQ ID NO: 5の配列を有する

25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

p49LHHLを含有する宿主細胞は、 V_L -L- V_H -L- V_H -L- V_L で誘導することができるポリペプチドを産生した。ここで V_L と V_H はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびしは上記アミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

CC49V_L-L- V_H -L- V_L -L- V_H (p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 6)とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を図6に示す。CC49V_L-L- V_H -L- V_L -L- V_H (p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9)を図7に示す。

pSL301HTの構築

pSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リヘニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)のペニシリナーゼP (penP) ターミナーターの配列を、Nhe I および BamH I で45分間消化することによって、pSCFV UHMと命名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後、4.5%ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気泳動させ、エタノールで沈殿させ、次に、同様に製造されたベクター：pSL301 (米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社)中の同じ部位に連結した。pSCFV UHMの製造手順は、1992年8月21日付け出版の米国特許第07/935,695号に記載されている。なおこの出版の開示事項は本願に採用するものである。一般に、pSCFV UHMは、penPプロモーターのヌクレオチド配列：固有Nco I 制限部位；CC49V_L領域；Hind III 制限部位；25個のアミノ酸のリンカー；固有Xho I 制限部位；CC49V_H領域；Nhe I 制限部位；penPターミナーター；およびBamH I 制限部位を含有している(図8参照)。このpenPプロモーターとpenPターミナーターは、Mezesら、J. Biol. Chem., 258巻、

11211~11218 頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応の一部(3 μL)を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートし次いで一夜増殖させたコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミナーター、インサートを含有するポテンシャルクローンを、Pharmacia社(米国、メリーランド州、ガイサースバーグ所在)のT7 Quickprime ³²P DNA 標識キットと、Bulowelsら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ粒によるコロニー溶解法とともに用いてスクリーニングした。プローブは、penP-Nhe I-BamH Iターミナーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使用した。陽性プローブであり、かつBamH I および Nhe I による消化物由来の207個の塩基対挿入断片(図6に示す1958~2165の塩基対(bp))を含有するクローンをpSL301Tと命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するのに選択した。Nhe I-BamH I penPターミナーターをpSL301中に配置した理由は、そのNhe IとBamH Iの部位の間のポリリンカー領域中に存在するEco47 III制限エンドヌクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Eco47 III部位が、構造体中に各連結V領域を配置するのにユニークである必要がある V_L と V_H の領域を縫って構築するため設計された。各V領域がEco47 III-Nhe I 部位に付加されると、Eco47 IIIは各場合に破壊されて、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEco47 III部位を形成した。

V_L配列は、PCR増幅の標的としてpSCFV UHMを用い、オリゴの5' SCP1と3' オリゴSCP5によってPCRで作製した。SCP1に対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAA CTC GAC GTT CAG TTG CAG CAG-3'

SCP5: 5' -TAA GCT ACC ACCA ACC GCT TAG TCA GCA GAC GGT CAC TCA GCT-3'

下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅されたV_LDNAを、4%のPAG、電気泳動、エタノールによる沈殿および20 μL水への溶解によって精製した。そのV_L配列をXho IとNhe Iの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され縫って精製されたpSL301Tベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4 μL)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。CC49V_Lインサートを含有していることを示す候補的クローンをNhe IおよびXho I消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB) 社(米国、オハイオ州クリーブランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB(pSL301ベクター中、Xho I 部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー)とCC49VHPを用いて、DNAの配列決定を行って、CC49V_Lの配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC49V_L配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドはpSL301-HHLTおよびpSL301-HLHTの両者を構築するときの出発点で使った。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQB(SEQ ID NO: 12) および CC49V_L(SEQ ID NO: 13)のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-3'

CC49VHP: 5' -GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG-3'

実施例1 p49LHHLの構築

pSL301HT(5 μg)を出発物質として用い、これをEco47 IIIおよびNhe Iで消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC49V_L挿入フラグメントは、5' オリゴとしてSCPGCを用いかつ

3' オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCP6Bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 14)は下記の通りである。

SCP6B: 5' -TAA TGC GCA GAT GAC GCA AGC AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT
GCC AAA AGC GAT GAC GGC AGC AAA GAT CTT GAG GTT CAG TTG CAG CAG
TCT-3'

またオリゴ SCPGCはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14のbp 8~76)を含有している。pSCFV UHM中のCC49VH標的でアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp 77~80由来のものである。

下線をつけた配列はPsp I 部位に相当する。得られたPCRインサートを精製し、Fsp IとNhe Iで消化し次いでpSL301HT Eco47 III-Nhe Iベクターとのリゲーション反応に用いた(図7)。コンピテント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(8 μL)で形質転換を行うのに用い、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301RHT生成物を示す正しい大きさのXho I-Nhe Iインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSQP1を用いて決定し、正しい配列(図7のヌクレオチド1124~1543)を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SQP1のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記の通りである。

SQP1: 5' -TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカーV_Lサブユニット(bp1544~1983、図7)は、5'オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP8aを用いかつPCRの標的としてpSCFV UHMを用いて製造した。SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記の通りである。

SCP7b: 5' -TAA TGC GCA GAT GAC GCA AGC AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT
GCC AAA AGC GAT GAC GGC AGC AAA GAT CTT GAC ATT GTC ATG TCA CAG TCT
CC

下線をつけたヌクレオチドは FspI 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18) は下記のとおりである。

SCP8a: 5' -TAAA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC
CAG CTT GGT CCC-3'

下線をつけた最初の一組は NheI 部位に相当し、もう一つの組は AflII 部位に相当する。SCP70のヌクレオチド 8~76はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド1544~1612)、一方V_Lにアニールするヌクレオチド77~99は図7の1613~1635に相当する。プライマー SCP8aは、その5'末端の短いテール、NheI 制限部位、終止コドン、AflII 制限部位およびV_Lの最後の21個の塩基を含有している。FspI と NheI による消化の後、この得られた 420bpのインサートを精製して複製pSL30HHTベクターの NheI と Eco47IIの部位に連結し、候補的なクローンを NheI と XhoI でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ49LFR2(-)とSQP1で配列が決定されて、pSL30IHHT中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 19) は下記のとおりである。

49LFR2(-): 5' -CTG CTG GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミドpSL30IHHTを XhoI および NheI で消化し、精製し、得られた1178bp V_L-リンカー-V_L-リンカー-V_Lセグメントを pSCPV UHMに連結して p49LHLHを製造した。なおこの pSCPV UHMは同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4μl部分)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞(Stratagene社)を形質転換し、LBCAM20 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素地区を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHLHを含有させるために選択した。p49LHLHは、CC49多価一本鎖抗体 scFv2: V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_HまたはCC48scFv2 (LHLH)のpenPプロモーターとヌクレオチ

D配列を含有している。

実施例2: p49LHLHの構築

p49LHLHの構築を図11に図式的に示す。リンカー-V_Lのサブユニットを5'オリゴの SCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9: 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC
AGC ACC AGC TTE GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド8~76)は図6のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124~1192に相当する)および図6のV_Lのヌクレオチド1193~1215に相当する。PCRに対する pSCPV UHM標的(ヌクレオチド77~99)にアニールした。

SCP8aは、NheI 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47II部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV領域を受けるための pSL30IHHTを作るのに必要な制限部位である。SCP9のヌクレオチド18~23は図6のヌクレオチド1532~1537(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24~46は、PCRにおけるSCP9のアニール領域である図6に示すヌクレオチド1508~1531に相当する。プラスミドpSL30IHHTを Eco47IIと NheI で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め FspI と NheI で処理され精製された、PCRからのリンカー-CC49V、DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3μl)を用いて大腸菌AG1 コンピテント細胞を形質転換し、次いで正しい XhoI - NheI の大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ PENPTSEQ2を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 21) は下記のとおりである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL30IHHTクローン中に PCRの誤まり

と欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド1533~1537に相当する5個の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1531はDNA配列のデータから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...GAAGCGCTT...であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然に Eco47II部位を形成した。図6のAGCGCTの配列はヌクレオチド1530, 1531, 1532, 1538, 1539および1540に相当する。この誤まりは次のステップで修正され、オリゴSCP8cの末端に5塩基の欠失を組込むことによってpSL30IHHTを製造した。

SCP8c: 5' -TAAGCGCTGATGATGCTAAGAAGGACGCCGCAAAAAA
GGACGACGCAAAAAAGATGATGCAAAAAAGGATCTGG
AGGTTCACTTCCAGCACTCTGAC-3'

SCP8c中の下線をつけた配列は Eco47II部位に相当する。PCRにおいて、SCP8cは5'オリゴとして用いられ一方SCP10は3'オリゴとして用いられ、リンカー-CC49V、セグメントが生成する。SCP10のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 23) は下記のとおりである。

SCP10: 5' -TTG TGC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA
CTG AGG TT-3'

SCP10中の下線をつけた配列は図8のヌクレオチド1958~1963に見られる NheI 部位に相当する。この場合、PCRインサートはNheI だけで消化され次いで精製される。ベクター(pSL30IHHT)はEco47II部位(先に形成されている)および NheI 部位で消化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3μl)を使ってコンピテント イー・コリAG1細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし次いで候補的クローンを XhoI と NheI でスクリーニングした。正しい大きさ

のDNAを有する3個のクローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ49VLCDSR(+)およびSQP1を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49VLCDSR(+))のDWQ ID NO: 24) は下記のとおりである。

49VLCDSR(+): 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図6のヌクレオチド1533~1963からの配列が確認され、正しいpSL30IHHTクローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHLHを製造するために、pSL30IHHT(5μg)を NheI と XhoI で消化し、次いでV_L-L-V_L-L-V_H配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCPV UHM(5μg)を XhoI と NheI で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4μl)を使ってコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物をLB-CAM20 プレート上にプレートし、次いで p49LHLHに対する代表的なクローンを、正しい制限酵素地図(図10参照)および TAG-72に対する生物活性に基づいて選択した。

実施例3 CC49 scFv2のLHLHとLHLHが共有結合した二量体の精製

CC49の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ細胞質の固分を、p49LHLHと p49LHLHの両者の1.0Lの一夜培養物から調製した。要約すると、培養物を250mLづつの4部分に分割し、Sorvall GS-8 ロータで10分間5000rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含有する10mM トリス-HCl pH 7.3からなる100mL中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計100mLの30mM トリス-HCl pH 3で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、40w/v %

のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL)および10mM EDTA pH 7.5(2.0mL)を添加した。得られた混合物を、時々攪拌しながら、室温に10分間保持した。高張性細胞(hypertonic cell)を前記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの氷冷0.5mM MgCl₂中に速やかに懸濁させ、次いで時々攪拌しながら氷上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の成分を含有する上段み液を、0.2μmのNalge社(米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の濾過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentricon 30およびCentricon 30で1.0mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたはp49LHLHのクローン由来の濃縮周辺細胞質のショック(Shockate)を、Pharmacia社(米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在)のSuperdex 75 HR 10/30 HPLCカラム(予めPBSで平衡化させたもの)に注入した。競合ELISA法で測定する場合、問題の生成物は0.5mL/分の流量で21~24分間放出させた。活性成分をブールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3~4回戻しながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料をPharmacia社のMono Q HR 5/5アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20mMトリス-HCl pH 7.6+0.5M NaClを用いる勾配プログラムを、1.5mL/minの流量で使用した。問題の生成物は、競合ELISA法で測定する場合、各々3~4分間カラムから放出させた。この時点の成分の、二つのSDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクマシーブリアン

トブルーR250で染色し、他方のゲルはウェスタン分析(ブローブ抗体としてビオチニル化FAID 14を使用)に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHEL)の種の計算分子量の単一バンドが、58,238ダルトンの位置に出現した。活性成分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いでPharmacia社のMono S HR 5/5カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの成分の5と6は、SDS-PAGE法およびELISA法で測定する場合、勾配液の使用が開始される直前に溶出された。したがってこれらの成分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで成分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S成分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は0.6mL/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

等電点電気泳動

精製性の等電点(pI)はDNASTAR社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のコンピュータプログラムProtein-Titrateを使用して予測した。アミノ酸組成、MWおよびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、FMC BioProducts社(米国、メーン州、ロックランド所在)のIsogel IEPプレートpH範囲3~10を使用して測定した。上記IEFを操作するために、Biorad社(米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在)の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V(設定)および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は90分間で完了した。Biorad社のIEP標準品は、フィコシアニン、βラクトグロ

ブリンB、ウシカルボニックアンヒドラーゼ、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマメレクチンおよびシトクロムCが含有され、pI値はそれぞれ4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 7.8, 8.00, 8.20および8.6であった。ゲルはFMCの指示にしたがって染色し染色した。DNASTARプログラムによって両方のscFv2の種のpI値として8.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の6.9の位置にみとめられた。

IgG, scFv2(LHLH)およびLHEL)のような精製CC49抗体は、280nm波長光の吸光度を分光学的に測定することによって定量した。モル吸光係数E₂₈₀は各々、先に引用したWellawferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG, CC49scFv2LHLH, CC49scFv2LHELおよびCC49scFv2のE₂₈₀(280nm)値はそれぞれ1.49, 1.65, 1.65および1.71であった。

実施例4

CC49scFv2の種のLHLHとLHELの相対活性を、IgGおよびCOOH末端にFLAGペプチドを有する単量体scFv型と比較した。

パーセント競合(percent competition)を下記式によってELISAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合}-\text{試料競取值 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ競合}-100\%競合} \times 100$$

“ゼロ競合(zero competition)”値は、1% BSAをビオチニル化CC49(3×10⁴~14モル)と1:1比率で混合して測定し、一方100%競合値はビオチニル化CC49IgGと混合したCC49IgGの5μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は405nm~450nmで測定した。3回の競取值の平均値を使

用した。最初に試料(25μL)を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10.10モルの結合部位/mLで塗布した。ビオチニル化CC49(4μg/μL: 20,000に希釈、25μL使用)で試料を1/2濃度に希釈した。連続希釈法(1:2)を行った。両方の形態のscFv2はIgGにほぼ等しい(図11参照)。別の試験で、CC49scFv単量体をFabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらはTAG-72に対する結合アフィニティが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の種に比べて全IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、そのCC49IgGの型と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存のIgG分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫治療法において腫瘍：組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

特許(内容に変更なし)

FIGURE 1

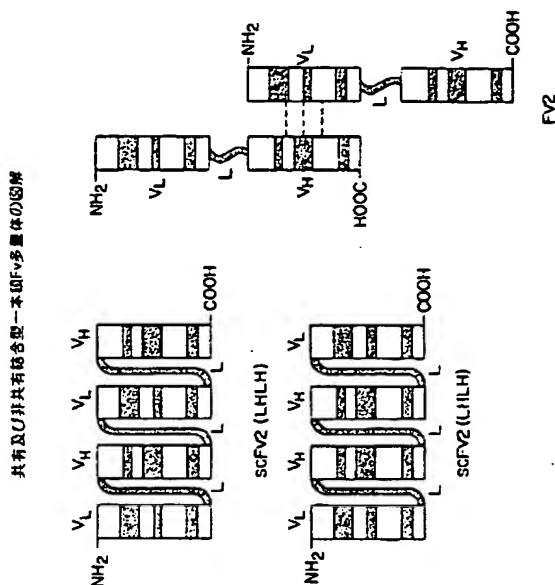


FIG. 2

GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA
 GTT GGC CAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC
 CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GGC TGC TAC
 CAG CAG AAA CCA GCG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG
 GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC
 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG
 AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT
 ACC TAT CCC CTC ACC TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG
 AAG

FIG. 3

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val
 Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 Pro Gly Cln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala
 Val Tyr Tyr Cys Cln Cln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
 Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

FIG. 4

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT
 GGC GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC
 TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TCG GTG AAA CAG AAC CCT GAA
 CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT
 GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGC TTC AAG GGC AAG GGC ACA CTG
 ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC GTG CAG CTC AAC
 AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA
 TCC CTG AAT ATG GCC TAC TCG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC
 GTC TCC TCA

FIG. 5

Glu Val Cln Leu Cln Cln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Cln Asn Pro Glu Cln Gly Leu
 Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr
 Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 Ser Ser Thr Ala Tyr Val Cln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp
 Gly Cln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

特許(内容に変更なし)

FIGURE 6

CCAG VL-L-VH-L-VH-L-VH/DNA及びP3ミ/複製

5'-C TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT CGA TGA ATT CCA TCA CTT CCC TCC 86
 GTT CAT TTG TCC CCG GTG GAA AGG TCA TCA TTT CCT TCC GAA AAA 94
 ACG GTT GCA TTT AAA TCT TAC ATA TAT AAT ACT TTC AAA GAC TAC ATT 102
 TGT AAG ATT TCA TGT TTT GGT CCG GTG AAA GAT GGT AGC TAC CAA TTA 190
 TTG TTT GGT GAT TGT TCA AGC CAT AAC ACT GTA CCG ATA GTG GAA 238
 GTG CTT CAT CTG GTT ACC ATC AAT CAA ATA TTC AAA CCG AGG GAG ACG 286
 -32 FENPR2- TAT AAG TTT GGC TCC CTC TC
 Met Lys Trp Leu Leu Pro Thr Ala Ala Cln Gly Leu Leu
 ATT TTG ATG AAA TAC CTA TTG CCG AGC GCA GCG GGT GGA TTG TTA TTA 334
 VL
 Neo I
 Leu Ala Cln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro 382
 CTC GCT CCC GAA CCA CCC ATG GGC GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA
 10 Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys
 TCC TCC CTA CTT GTG GTT GGC GAC AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG 430
 30 Ser Ser Cln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Trp Leu Ala
 TCC ACT CAG ACC CTT TTA TAT ACT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GGC 478

FIG. 6D

Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Thr Ser
 TTC TGT ACA ACC TCC CTC AAT ATG GCC TAC TCG GGT CAA G
 240
 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala
 CTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT
 250
 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile
 AAA AAA GAC GAT GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC ATT
 260
 Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys
 GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA GCT ATG TCA GTT GGG GAG AAG
 270
 Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn
 GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC ACT CAG AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT
 280
 Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Tyr Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 CAA AAG AAC TAC TTG GCC TCG TAC CAG CAG AAA CCA GCG CAG TCT CCT
 290
 300
 310
 320
 330

FIG. 6B

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
 TGG TAC CAG CAG AIA CCA GCG CAG TCT CCT AAA CTC CTC ATT TAC TGG
 50
 Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG CTC CCT GAT GCG TTC ACA GCG ACT GCA
 60
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Gln Asp
 TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC ACT CTC AAG ACT GAA GAC
 70
 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
 CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC ACC TTC
 80
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys
 GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTC AAG CTT AGT GCG GAC GAT GCG AAA
 90
 100
 110
 120
 130
 140
 150
 160
 170
 180
 190
 200
 210
 220
 230
 240

FIG. 6E

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp
 AAA CTG CTG ATT TAC TCG GCA TCC CCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT
 330
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser
 GCG TTC ACA GCG ACT GCA TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC
 340
 Ser Val Lys Thr Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 ACT GTG AAG ACT GAA GAC CTC GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT
 350
 AGC TAT 360
 AGC TAT CCC CTC AGC TTC GGT GGT GCG ACC AAG CTC GTG CTG AAG CTA
 370
 Ser Val Lys Thr Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 ACT GTG AAG ACT GAA GAC CTC GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT
 380
 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gln Ala Gly Thr Lys Leu Val Lys Leu
 AGC TAT CCC CTC AGC TTC GGT GGT GCG ACC AAG CTC GTG CTG AAG CTA
 390
 EcoRI III
 Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys
 AGC GCT GAT GAT GCT AAG AAG GAC GCC GCA AAA AAG GAC GCA AAA
 400
 Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Ser Asp
 AAG CAT GAT GCA AAA AAG GAT CTC GAG GTT CAG TTC CAG CAG TCT CAC
 410
 Ala Gln Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala
 GCT GAG TTG GTG AAA CCT GCG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TCG AAG GCT
 420
 430
 440
 450
 460
 470
 480
 490
 500

FIG. 6C

Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Val Lys Pro
 GAC CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT
 150
 Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 GCG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TCG AAG GCT TCT GCG TAC ACC TTC ACT
 160
 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Gly Leu Gln
 GAC CAT GCA ATT CAC TCG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GCG CTG GAA
 170
 Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Gln
 TCG ATT GCA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAC
 180
 Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr
 ACG TTC AAG GCG AAG GCG ACA CTC ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT
 190
 Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr
 GCG TAC GTG CAG CTC AIC AGC CTC ACA TCT CAG GAT TCT GCA CTG TAT
 200
 210
 220
 230
 240

浄書(内容に変更なし)

FIGURE 7

CC49 VL-L-VH-L-VLのDNA及びアミノ酸配列

5'-C	TCA	TGT	TTG	ACA	GCT	TAT	CAT	CGA	TGA	ATT	CCA	TCA	CTT	CCC	TCC	46
Cis I EcoR I																
GTT	CAT	TTG	TCC	CGG	GTG	GAA	ACG	AGG	TCA	TAT	TTT	CCT	TCC	GAA	AAA	94
ACG	GTT	GCA	TTT	AAA	TCT	TAC	ATA	TAT	TAT	AAT	ACT	TTT	AAA	GAC	TAC	162
TGT	AAG	ATT	TGA	TGT	TTG	AGT	CGG	CTG	AAA	GAT	CGT	ACG	TAC	CAA	TTA	190
TTG	TTT	CGT	GAT	TGT	TCA	AGC	CAT	AAC	CTT	GTA	GCG	ATA	GTG	GAA		238
GTG	CTT	CAT	CTG	GTT	ACG	ATC	ATA	CAA	TTC	CAA	CGG	ACG	GAG	ACG		286
PENPR2- TAT AAG TTT GCG TCC CTC TG																
-22																
ATT	TTG	ATG	AAA	TAC	TAT	CTT	CTG	ACA	GCG	GCT	GGA	TTG	TTA	TTA		334
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu																
Nco I VL																
Leu	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Asp	Ile	Val	Met	Ser	Gln	Ser	Pro	
CTC	GCT	GCC	CAA	CCA	GCC	ATG	GCC	GAC	ATT	GTG	TAT	TCA	CAG	TCT	CCA	382
10																
Ser	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Gly	Gly	Lys	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys		
TCC	TGC	CTA	GCT	GTG	TCA	GTT	GGC	GAG	AAG	GTT	ACT	TTG	AGC	TGC	AAG	430-
20																

FIG. 7B

Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	478
TCC	AGT	CAG	AGC	CTT	TTA	TAT	AGT	AGT	AAT	CAA	AAG	AAC	TAC	TTG	GGC	
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	
TGC	TAC	CAG	CAG	AAA	CCA	GGG	CAG	TCT	GCT	AAA	CTG	CTG	ATT	TAC	TGG	
Ala	Ser	Ala	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	
GCA	TCC	GCT	ACG	GAA	TCT	GCG	GTC	GCT	GAT	CGC	TTC	ACA	GGC	AGT	GGA	
Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Ser	Val	Lys	Thr	Glu	Asp	
TCT	GGG	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	TCC	ATC	AGC	ACT	GTC	AAG	ACT	GAA	GAC	
Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	
CTG	CCA	GTT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAG	TAT	TAT	ACC	TAT	CCC	CTC	ACG	TTC	
Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Val	Leu	Lys	Leu	Ser	Ala	Asp	Asp	Ala	Lys	
GGT	GCT	GGG	ACC	AGC	AGC	CTG	CTG	AGC	CTT	ACT	GGC	GAC	GAT	GGC	AAA	
Lys	Asp	Ala	Ala	Lys	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Lys	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	
ATC	GAT	GAT	CCG	AGA	AGG	AGT	GAT	GAC	GCT	AAA	GAC	GAT	GCT	AAA	AGC	
TTC	GTA	GCA	GCG	CTC	TTT	CTA	THNNL(-)	JSQG								

FIG. 6F

Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	His	Ala	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Asn
TCT	GGC	TAC	ACC	TTC	ACT	CAC	CAT	GCA	AAT	CAC	TGC	GTG	AAA	CAG	AAC
890															
Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Phe	Ser	Pro	Cys	Asn	Arg
CCT	GAA	CAG	GGC	CTG	GAA	TGC	ATT	GGA	TAT	TTT	TCT	CCC	GGA	AAT	GAT
880															
Asp	Phe	Lys	Tyr	Asp	Glu	Arg	Pro	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala
CAT	TTT	AAA	TAC	AAT	GAG	AGG	TTC	AGG	GAG	AGC	ACA	CTG	ACT	GCA	GGA
870															
Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Val	Gln	Leu	Ian	Ser	Leu	Thr	Ser
GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACT	GCG	TAC	CTG	CAG	CTC	AAC	AGC	CTG	ACA	TCT
860															
Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Thr	Arg	Ser	Leu	Asn	Met	Ala	Tyr
GAG	CAT	TCT	GCA	GTG	TAT	TTC	TGT	ACA	AGA	TCC	CTG	AAT	ATG	GCC	TAC
850															
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	***	Whe	1	
TGG	GGT	CAA	GGA	ACC	TCA	GTG	ACC	GTG	TGC	TCA	TAA	AAA	CCT	AGC	GAT
840															

FIG. 6G

GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GGT	2014
SQP1- TGT AGT AGA ATG TAT TTC AGT PENTSEQ2- G TAT TTC AGT GAA CCA CTA GTT	
CAT ATC ATT GTC CGG CAA TCG TGT GGG CTT TTT TTG TTT TGT ATC TTT	2062
AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAC GGG AAA ATC GGT CTG CGG GAA AGG ACC	2110
GGG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CGG AAT CGG TTC GAT TGT GAC AAA ATT	2158
BamH I CGG ATC C-3'	2165

FIG. 7C

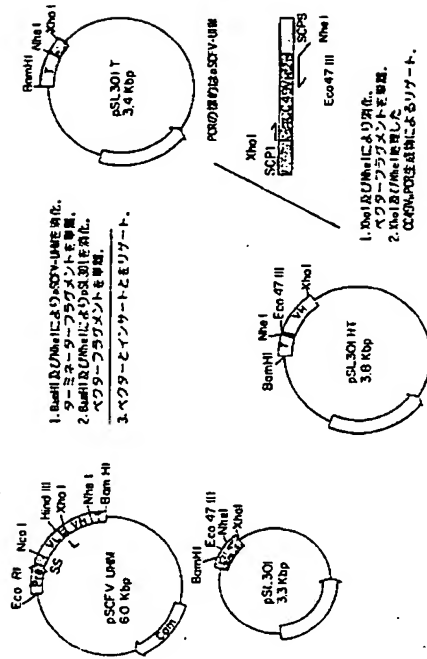
150
 180
 190
 200
 210
 220
 230
 240
 250
 260
 270
 280
 290
 300
 310
 320
 330
 340
 350
 360
 370
 380
 390
 400
 410
 420
 430
 440
 450
 460
 470
 480
 490
 500
 510
 520
 530
 540
 550
 560
 570
 580
 590
 600
 610
 620
 630
 640
 650
 660
 670
 680
 690
 700
 710
 720
 730
 740
 750
 760
 770
 780
 790
 800
 810
 820
 830
 840
 850
 860
 870
 880
 890
 900
 910
 920
 930
 940
 950
 960
 970
 980
 990
 1000
 1010
 1020
 1030
 1040
 1050
 1060
 1070
 1080
 1090
 1100
 1110
 1120
 1130
 1140
 1150
 1160
 1170
 1180
 1190
 1200
 1210
 1220
 1230
 1240
 1250
 1260
 1270
 1280
 1290
 1300
 1310
 1320
 1330
 1340
 1350
 1360
 1370
 1380
 1390
 1400
 1410
 1420
 1430
 1440
 1450
 1460
 1470
 1480
 1490
 1500
 1510
 1520
 1530
 1540
 1550
 1560
 1570
 1580
 1590
 1600
 1610
 1620
 1630
 1640
 1650
 1660
 1670
 1680
 1690
 1700
 1710
 1720
 1730
 1740
 1750
 1760
 1770
 1780
 1790
 1800
 1810
 1820
 1830
 1840
 1850
 1860
 1870
 1880
 1890
 1900
 1910
 1920
 1930
 1940
 1950
 1960
 1970
 1980
 1990
 2000
 2010
 2020
 2030
 2040
 2050
 2060
 2070
 2080
 2090
 2100
 2110
 2120
 2130
 2140
 2150
 2160
 2170
 2180
 2190
 2200
 2210
 2220
 2230
 2240
 2250
 2260
 2270
 2280
 2290
 2300
 2310
 2320
 2330
 2340
 2350
 2360
 2370
 2380
 2390
 2400
 2410
 2420
 2430
 2440
 2450
 2460
 2470
 2480
 2490
 2500
 2510
 2520
 2530
 2540
 2550
 2560
 2570
 2580
 2590
 2600
 2610
 2620
 2630
 2640
 2650
 2660
 2670
 2680
 2690
 2700
 2710
 2720
 2730
 2740
 2750
 2760
 2770
 2780
 2790
 2800
 2810
 2820
 2830
 2840
 2850
 2860
 2870
 2880
 2890
 2900
 2910
 2920
 2930
 2940
 2950
 2960
 2970
 2980
 2990
 3000
 3010
 3020
 3030
 3040
 3050
 3060
 3070
 3080
 3090
 3100
 3110
 3120
 3130
 3140
 3150
 3160
 3170
 3180
 3190
 3200
 3210
 3220
 3230
 3240
 3250
 3260
 3270
 3280
 3290
 3300
 3310
 3320
 3330
 3340
 3350
 3360
 3370
 3380
 3390
 3400
 3410
 3420
 3430
 3440
 3450
 3460
 3470
 3480
 3490
 3500
 3510
 3520
 3530
 3540
 3550
 3560
 3570
 3580
 3590
 3600
 3610
 3620
 3630
 3640
 3650
 3660
 3670
 3680
 3690
 3700
 3710
 3720
 3730
 3740
 3750
 3760
 3770
 3780
 3790
 3800
 3810
 3820
 3830
 3840
 3850
 3860
 3870
 3880
 3890
 3900
 3910
 3920
 3930
 3940
 3950
 3960
 3970
 3980
 3990
 4000
 4010
 4020
 4030
 4040
 4050
 4060
 4070
 4080
 4090
 4100
 4110
 4120
 4130
 4140
 4150
 4160
 4170
 4180
 4190
 4200
 4210
 4220
 4230
 4240
 4250
 4260
 4270
 4280
 4290
 4300
 4310
 4320
 4330
 4340
 4350
 4360
 4370
 4380
 4390
 4400
 4410
 4420
 4430
 4440
 4450
 4460
 4470
 4480
 4490
 4500
 4510
 4520
 4530
 4540
 4550
 4560
 4570
 4580
 4590
 4600
 4610
 4620
 4630
 4640
 4650
 4660
 4670
 4680
 4690
 4700
 4710
 4720
 4730
 4740
 4750
 4760
 4770
 4780
 4790
 4800
 4810
 4820
 4830
 4840
 4850
 4860
 4870
 4880
 4890
 4900
 4910
 4920
 4930
 4940
 4950
 4960
 4970
 4980
 4990
 5000
 5010
 5020
 5030
 5040
 5050
 5060
 5070
 5080
 5090
 5100
 5110
 5120
 5130
 5140
 5150
 5160
 5170
 5180
 5190
 5200
 5210
 5220
 5230
 5240
 5250
 5260
 5270
 5280
 5290
 5300
 5310
 5320
 5330
 5340
 5350
 5360
 5370
 5380
 5390
 5400
 5410
 5420
 5430
 5440
 5450
 5460
 5470
 5480
 5490
 5500
 5510
 5520
 5530
 5540
 5550
 5560
 5570
 5580
 5590
 5600
 5610
 5620
 5630
 5640
 5650
 5660
 5670
 5680
 5690
 5700
 5710
 5720
 5730
 5740
 5750
 5760
 5770
 5780
 5790
 5800
 5810
 5820
 5830
 5840
 5850
 5860
 5870
 5880
 5890
 5900
 5910
 5920
 5930
 5940
 5950
 5960
 5970
 5980
 5990
 6000
 6010
 6020
 6030
 6040
 6050
 6060
 6070
 6080
 6090
 6100
 6110
 6120
 6130
 6140
 6150
 6160
 6170
 6180
 6190
 6200
 6210
 6220
 6230
 6240
 6250
 6260
 6270
 6280
 6290
 6300
 6310
 6320
 6330
 6340
 6350
 6360
 6370
 6380
 6390
 6400
 6410
 6420
 6430
 6440
 6450
 6460
 6470
 6480
 6490
 6500
 6510
 6520
 6530
 6540
 6550
 6560
 6570
 6580
 6590
 6600
 6610
 6620
 6630
 6640
 6650
 6660
 6670
 6680
 6690
 6700
 6710
 6720
 6730
 6740
 6750
 6760
 6770
 6780
 6790
 6800
 6810
 6820
 6830
 6840
 6850
 6860
 6870
 6880
 6890
 6900
 6910
 6920
 6930
 6940
 6950
 6960
 6970
 6980
 6990
 7000
 7010
 7020
 7030
 7040
 7050
 7060
 7070
 7080
 7090
 7100
 7110
 7120
 7130
 7140
 7150
 7160
 7170
 7180
 7190
 7200
 7210
 7220
 7230
 7240
 7250
 7260
 7270
 7280
 7290
 7300
 7310
 7320
 7330
 7340
 7350
 7360
 7370
 7380
 7390
 7400
 7410
 7420
 7430
 7440
 7450
 7460
 7470
 7480
 7490
 7500
 7510
 7520
 7530
 7540
 7550
 7560
 7570
 7580
 7590
 7600
 7610
 7620
 7630
 7640
 7650
 7660
 7670
 7680
 7690
 7700
 7710
 7720
 7730
 7740
 7750
 7760
 7770
 7780
 7790
 7800
 7810
 7820
 7830
 7840
 7850
 7860
 7870
 7880
 7890
 7900
 7910
 7920
 7930
 7940
 7950
 7960
 7970
 7980
 7990
 8000
 8010
 8020
 8030
 8040
 8050
 8060
 8070
 8080
 8090
 8100
 8110
 8120
 8130
 8140
 8150
 8160
 8170
 8180
 8190
 8200
 8210
 8220
 8230
 8240
 8250
 8260
 8270
 8280
 8290
 8300
 8310
 8320
 8330
 8340
 8350
 8360
 8370
 8380
 8390
 8400
 8410
 8420
 8430
 8440
 8450
 8460
 8470
 8480
 8490
 8500
 8510
 8520
 8530
 8540
 8550
 8560
 8570
 8580
 8590
 8600
 8610
 8620
 8630
 8640
 8650
 8660
 8670
 8680
 8690
 8700
 8710
 8720
 8730
 8740
 8750
 8760
 8770
 8780
 8790
 8800
 8810
 8820
 8830
 8840
 8850
 8860
 8870
 8880
 8890
 8900
 8910
 8920
 8930
 8940
 8950
 8960
 8970
 8980
 8990
 9000
 9010
 9020
 9030
 9040
 9050
 9060
 9070
 9080
 9090
 9100
 9110
 9120
 9130
 9140
 9150
 9160
 9170
 9180
 9190
 9200
 9210
 9220
 9230
 9240
 9250
 9260
 9270
 9280
 9290
 9300
 9310
 9320
 9330
 9340
 9350
 9360
 9370
 9380
 9390
 9400
 9410
 9420
 9430
 9440
 9450
 9460
 9470
 9480
 9490
 9500
 9510
 9520
 9530
 9540
 9550
 9560
 9570
 9580
 9590
 9600
 9610
 9620
 9630
 9640
 9650
 9660
 9670
 9680
 9690
 9700
 9710
 9720
 9730
 9740
 9750
 9760
 9770
 9780
 9790
 9800
 9810
 9820
 9830
 9840
 9850
 9860
 9870
 9880
 9890
 9900
 9910
 9920
 9930
 9940
 9950
 9960
 9970
 9980
 9990
 10000

FIG. 7E

1534
 1582
 1630
 1678
 1726
 1774
 1822
 1870
 1918
 1966
 2014
 2062
 2110
 2158
 2165
 2213
 2261
 2309
 2357
 2405
 2453
 2501
 2549
 2597
 2645
 2693
 2741
 2789
 2837
 2885
 2933
 2981
 3029
 3077
 3125
 3173
 3221
 3269
 3317
 3365
 3413
 3461
 3509
 3557
 3605
 3653
 3701
 3749
 3797
 3845
 3893
 3941
 3989
 4037
 4085
 4133
 4181
 4229
 4277
 4325
 4373
 4421
 4469
 4517
 4565
 4613
 4661
 4709
 4757
 4805
 4853
 4901
 4949
 4997
 5045
 5093
 5141
 5189
 5237
 5285
 5333
 5381
 5429
 5477
 5525
 5573
 5621
 5669
 5717
 5765
 5813
 5861
 5909
 5957
 6005
 6053
 6101
 6149
 6197
 6245
 6293
 6341
 6389
 6437
 6485
 6533
 6581
 6629
 6677
 6725
 6773
 6821
 6869
 6917
 6965
 7013
 7061
 7109
 7157
 7205
 7253
 7301
 7349
 7397
 7445
 7493
 7541
 7589
 7637
 7685
 7733
 7781
 7829
 7877
 7925
 7973
 8021
 8069
 8117
 8165
 8213
 8261
 8309
 8357
 8405
 8453
 8501
 8549
 8597
 8645
 8693
 8741
 8789
 8837
 8885
 8933
 8981
 9029
 9077
 9125
 9173
 9221
 9269
 9317
 9365
 9413
 9461
 9509
 9557
 9605
 9653
 9701
 9749
 9797
 9845
 9893
 9941
 9989
 10037
 10085
 10133
 10181
 10229
 10277
 10325
 10373
 10421
 10469
 10517
 10565
 10613
 10661
 10709
 10757
 10805
 10853
 10901
 10949
 10997
 11045
 11093
 11141
 11189
 11237
 11285
 11333
 11381
 11429
 11477
 11525
 11573
 11621
 11669
 11717
 11765
 11813
 11861
 11909
 11957
 12005
 12053
 12101
 12149
 12197
 12245
 12293
 12341
 12389
 12437
 12485
 12533
 12581
 12629
 12677
 12725
 12773
 12821
 12869
 12917
 12965
 13013
 13061
 13109
 13157
 13205
 13253
 13301
 13349
 13397
 13445
 13493
 13541
 13589
 13637
 13685
 13733
 13781
 13829
 13877
 13925
 13973
 14021
 14069
 14117
 14165
 14213
 14261
 14309
 14357
 14405
 14453
 14501
 14549
 14597
 14645
 14693
 14741
 14789
 14837
 14885
 14933
 14981
 15029
 15077
 15125
 15173
 15221
 15269
 15317
 15365
 15413
 15461
 15509
 15557
 15605
 15653
 15701
 15749
 15797
 15845
 15893
 15941
 15989
 16037
 16085
 16133
 16181
 16229
 16277
 16325
 16373
 16421
 16469
 16517
 16565
 16613
 16661
 16709
 16757
 16805
 16853
 16901
 16949
 16997
 17045
 17093
 17141
 17189
 17237
 17285
 17333
 17381
 17429
 17477
 17525
 17573
 17621
 17669
 17717
 17765
 17813
 17861
 17909
 17957
 18005
 18053
 18101
 18149
 18197
 18245
 18293
 18341
 18389
 18437
 18485
 18533
 18581
 18629
 18677

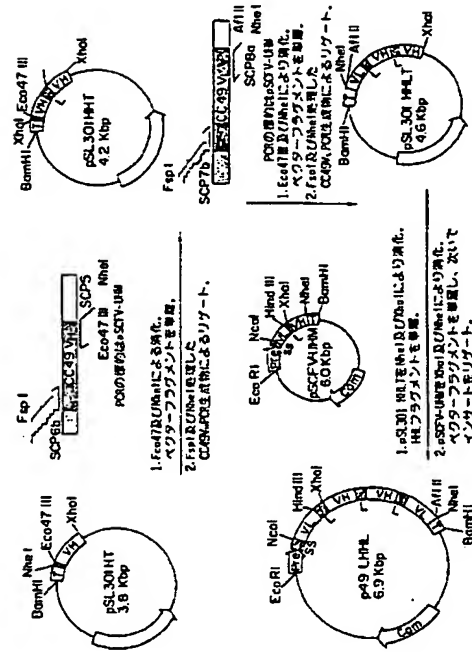
特許(内容に変更なし)

FIGURE 8



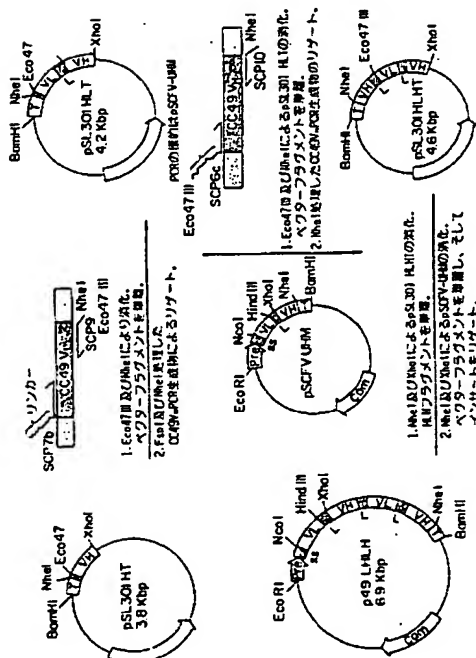
特許(内容に変更なし)

FIGURE 9



特許(内容に変更なし)

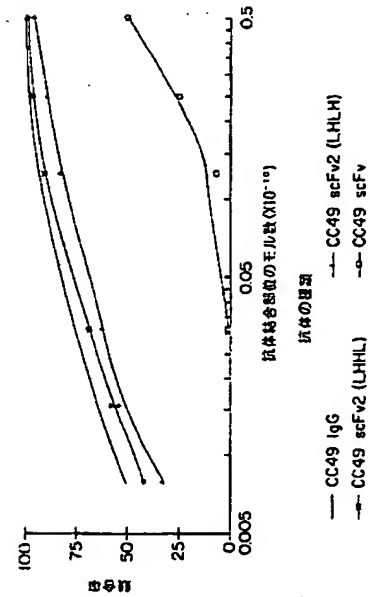
FIGURE 10



特許(内容に変更なし)

FIGURE 11

CC49 IgG, SCFv2 と SCFv2 の融合アッセイ
融合図式: ビオチニル化CC49 IgG



平成6年 9 月 1 日

特許庁長官 高 島 重 郎

1. 事件の表示
- PCT/US93/12039

- ## 2 発明の名称
- 多価の一本四柱体

- 1 補正をする者
- | | |
|--------|-------|
| 事件との関係 | 特許出願人 |
|--------|-------|

名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

4. 代理人
住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 野光虎ノ門ビル
貴和特許法律事務所 電話 3504-0721

氏名 弁理士(7751)石 田 敏

- 5 改正命令の日付
自発改正

- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文

- (2) 図面の翻訳文
(3) 委任状

7. 補正の内容
- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文の浄書（内容に変更なし）
 - (2) 図面の翻訳文の浄書（内容に変更なし）
 - (3) 明細書の通り



國 際 同 友 報 告

国 际 调 查 告 白

Form 10 (Rev. 12-1-79)
PCT/AS 93/12539

CLASSIFICATION (PCT/AS 93/12539)
IPC 5 C12N1/15 C07K1/28 C12N1/52 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) of 1989, technical classification and IPC

2. PRIORITY CLAIMS (PCT/AS 93/12539) (Indicate priority claims referred by international system)

IPC 5 C12N C07K

Indicate whether other than documents disseminated to the public has been disseminated or intended to be disseminated

Indicate date first conceived during the international search period of this, first and, other priorities, except where they

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Category of document, with reference, where appropriate, of the storage category	Reference to document
X	WO/A.91 19739 (CELTECH LIMITED) 26 December 1991 see example 1	1,5
Y	-----	2-4,6
Y	CANCER RESEARCH vol. 52, no. 12, 15 June 1992, PHILADELPHIA, PA, USA pages 3403 - 3408 T. YOKOTA ET AL. 'Rapid tumor penetration of a single-chain Fc and comparison with other immunoglobulin forms' see page 3403, column 3, paragraph 4	3,6

-/-

X Further documents are listed in the annexes of item C.

Y Patent family members are listed in annex.

1. General description of the document

- *A. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *B. Further documents are listed in the annexes of item C.
- *C. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *D. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *E. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *F. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *G. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *H. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *I. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *J. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *K. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *L. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *M. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *N. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *O. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *P. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *Q. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *R. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *S. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *T. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *U. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *V. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *W. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *X. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *Y. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document
- *Z. Information relating to the patent type of the document is not available in the patent document

Date of the international search of the international search

Date of the search of the international search report

25 March 1994

27 -04- 1994

Printer and address of the first
inventor: Philip Cohen, P.O. Box 10000, 1
Tel.: 1-408-244-2000, Fax: 1-408-244-2001
Pat. - 1-408-244-2001

Authorship office

Curcio, W

國際調查報告

C.C. Communications - INFORMATION CONTAINED HEREIN IS UNCLASSIFIED		Date: 11/11/2000 PCT/US 93/12039
Category	Content of document, with addition, where appropriate, of the relevant passage	Reference to class No.
V	BIOCHEMISTRY vol. 30, no. 42, 22 October 1991, EASTON, PA US pages 10137 - 10125 H.W.PANTOLIANO ET AL. 'Conformational stability, folding and ligand-binding affinity of single-chain B γ immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli' cited in the application see page 10120, column 1, paragraph 2	2, 4
X	EP,A,D 506 124 (TANDEM BIOSYSTEMS, INC.) 30 September 1992 see example 4	2, 6
P,X	WO,A,93 11161 (ENZOS, INC.) 10 June 1993 see figure 19A	1, 3-6

● 國 國 產 產 告

Patent documents issued in various foreign		Publication date	Patent family (member(s))	Publication date
WO-A-9119733	28-12-91	AU-A- EP-A- GB-A- JP-T-	7833191 0486552 2250993 1602039	07-01-92 27-05-92 24-04-92 18-04-93
EP-A-C506124	30-09-92	AU-B- AU-A- JP-A-	640563 1295282 5117164	03-09-93 15-10-92 14-05-93
WO-A-9311161	10-06-93	AU-A-	3178993	28-05-93

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 16/46		8318 -4H	
C 1 2 N 15/09	Z N A		
//(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:19)			

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平7-503622

【公表日】平成7年(1995)4月20日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-514437

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

C07K 16/00

16/18

16/32

16/46

C12N 15/09 ZNA

//C12P 21/08

C12R 1:19)

【F I】

C12P 21/08 9358-4B

C07K 16/00 9356-4H

16/18 9356-4H

16/32 9356-4H

16/46 9356-4H

C12N 15/00 ZNA A 9282-4B

手 続 補 正 書

明 細 書

平成9年 7月 2 日

多価の一不飽和糖

特許庁長官 鹿 井 高 光 君

1. 事件の表示

平成6年特許第514437号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ザウケミカルカンパニー

3. 代理人

〒105 東京都港区虎ノ門三丁目番地1号 虎ノ門野村ビル

野村法律事務所 電話 03-5470-1920

氏名 戸部士(7:51) 石 田 敬 二 郎
〒105 東京都港区虎ノ門三丁目番地1号 虎ノ門野村ビル

4. 補正対象事項

明細書及び請求の範囲

5. 補正対象項目

明細書及び請求の範囲

6. 補正の内容

(1) 明細書を前記の通り補正します。

(2) 請求の範囲を前記の通り補正します。

7. 添付書類の提出

(1) 明 細 書

1 通

(2) 請求の範囲

1 通



本発明は、本願の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に応じて免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は4個の重鎖、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成る。重鎖は一本の可変ドメインと、2本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両方に由来する、それぞれV_L及びV_Hと称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保守されたフレームワーク領域(FR)によりフラグメントされている3つの相補的決定領域(CDR)を含んで成ることを示す。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性によって型であり、かつ抗体の結合の特異性の原因であると想定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを有するため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは6個の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝子系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は特異的及び治療的の両方として使用とされている。モノクローナル抗体は、重組された下痢に似、マウスのリンパ球と融合したマウスミエロマ細胞系との融合により作られるハイブリドマにより巨量的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にとっての不足は抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発される抗モノクローナル抗体反応に基づき制約されている。

モノクローナル抗体は、一つの種に由来する抗体の種内又は種間免疫原性が別の種に由

果すその両者の芝居張りと見合されたものが狂歌 885万法蘭により作られている。例えば、Sabaguchi, I. Munemasa, (137: 1066-1074 (1939)); Suwa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1987); Yoshikawa, in: Cancer Res., 47: 999-1005 (1987); 及び Li, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987); を参照のこと。これらに群間関連検定に対するキヤノニカル関数を示している。典型的には、キヤノニカル関数の可逆性およびトポロジー的定常性値に逆対応している。異なるキヤノニカル関数との比較において大部分がゼロであるため、それらはキヤノニカル性より免疫性との距離に低いものと予測されている。

本マダラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その運動力學に影響を及ぼすタンパク質複合体のうちの主要部分を形成する抗体を含有している。免疫法による免疫診断における抗体の利用のため、免疫結合に迅速に反応し、且つ結合する抗体分子を得ること、及び未結合の抗体が身体から迅速に排除されることが希望される。一般に、小さな可溶性の抗体フラグメントは高めの毛皮浸透性を示しており、そしてその性質はより大きな抗体よりもよく知られている。

既成と見做すのは砂眼及び鼻障の可成程度であるため、一匹のV₁と一匹のV₂とにより一歩眼状体フラグメント (effs) が作られており、これら二つのeffsを含む、それらはペプサマリカ (オタク特許第 4,391,978号) により選択されたV₁-L₁ V₂とリペプチドを産しており、ここでLはペプサマリカ₁を含有している。V₁とV₂とドメインが互同V₁・L₁と異なるseqが公衆特許番号US2002/005746号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の2つの結合部位と比べて seFyH は、一つのそれをおず
るため、 seFyH は2以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このオリペプチドの活性を高めるため、残基の塩基配列を制御又は高めるため、塩基配列内部位を有する1つ以上の塩基を含有することが有利であろう。加えて、鎖状組織上の特定のエピソードの認識を可能とする、別の免疫ニセ因子-抗原の類似ベース構造を可能とする、又は亦またはは必須成分の抗体結合を可能とする二価性異質的であつた多価setを含有することが有利であろう。

それぞれ異ペプチドリシナーにより共有結合している一分子の V_n と一本の V

ドメインとを有する一本鎖体はフラグメントは、真二倍体ドミノノミによってたれ結合されて、完全抗体の結合能力を維持している多価一本鎖抗体を形成できることが発見された。 懸念において、本発明は抗体に対する有用性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は二本以上の重鎖ドメインと二本以上の軽鎖ドメインとを含んで成り、ここで各重ドミノは少なくともより一つの別の重ドメインと連結している。

物性試験において、本研究は2本以上の一本鎖体フラグメントを含んで成る多量一本鎖体であり、各フラグメントに試験に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(3) 脂肪質を多く含む第一流リペブチド:

(ト) 四酸化モリブデンを含んで成る第二ポリバブサド：及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと通達せしめる第二ペプチドリンカー；

別の懸梯において、本質氏は、多価一本鎖抗体をコードする【B】断片を警告し、ここでこの多価の一本鎖抗体は2以上の一次鎖抗体フラグメントを包含しており、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは:

(8) 経腸可溶ドメインを食んで吐く第一ポリペプチド:

(b) 真鍮可成メインを含んで成る第二ポリペプチド：及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリinker；

この多価一価抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するか、サイズにおいてもっと小さく、より流動的な系を通過を可能とする抗体フラグメントの含有を可能とする。多価一価抗体は、結合部位が二糖鎖の位置決定並でありうる多価一本鎖抗体の構築上可成とするであろう。

英國の商標登録

図1は、 V_L - L - V_R - $[-V_L$ - L - V_R (LHC3) と V_L - L - V_R - $[-V_L$ (LHC2) の形を有する共有結合型一本鎖液体及び非共有結合型 Ps - α 結合体(FY2)を示す

図2は、CF49N、(SF6 1E 20・1)のスクリーン配製を示す。

図 3 は CC49V₁ (SEQ ID NO: 2) のアミノ酸配列を示す。

※4はCC18V₀ (SEQ ID NO: 3) のヌクレオチド配列を示す。

図 5 は CC49N₂ (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を示す。

図6は pDLELE(SEQ ID NO: 6) におけるC243—ニシ酸抗体1111のスクレオチド配列をアミノ酸配列を示す。

図7は p49LH1 (SEQ ID NO: 8) におけるCC49—結合部位LH1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 8 はプラスミド pSL3017 及び pSL301ET の構造を示す。

図9はプラスチック p4GLHBLの構造を示す。

図10はプラスミド pGLKLEの構造を示す。

又11は20491gC, 20493fF2及び20494sFfを用いた、融合図式としてジオナニル化 20491g2を用いる融合アクセスの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に託入れる。

酸、アミノ酸、ペプチド、保護品、活性基等を与え、それらに反応し、
B (Commission on Biological Nomenclature) 又は関連分野の専門に就いて研
究している。

本明細書で用いる「一本鎖状体フラグメント」(scP)又は「断片フラグメント」なる語は、 V_1 、 \dots 、 V_n により表わされる、ペプチドリンカー(L)により V_1 ドメインに連結された V_2 ドメインを含むポリペプチドを意味する。 V_1 と V_2 ドメインとの順序は逆であってよく、 V_2 、 \dots 、 V_n として表わされるポリペプチドが候補である。「ドメイン」に、特定の領域、例えば免疫結合又は抗原に結合するタンパク質のセグメントを、指す。

「多合一五級柱体」はペプナドリシカーにより共有結合した2以上の一本鎖状

体フラグメントを産生する。この氷結フラグメントは連結されて、

$$F_1 = -\frac{1}{2}V_1 - \frac{1}{2}V_2 - \frac{1}{2}V_3; \quad V_1 = -\frac{1}{2}V_2 - \frac{1}{2}V_3 - \frac{1}{2}V_4; \quad V_2 = \frac{1}{2}V_1 - \frac{1}{2}V_3 - \frac{1}{2}V_4;$$

: 36

$$S_H = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \frac{V_1}{V_2} = -\frac{1}{2} \frac{V_1}{V_2} = -\frac{1}{2} \frac{V_1}{V_2}$$

のⅡ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ。Ⅲノインの順序を有する二省の一不随合体を形成してよい。

三番以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチド間リンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された。又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な型様においては、 V_L と V_H ドメインの数は等しい。

本題では、

$$v_1 = -1-v_2 = -1-v_3 \text{ 又は } v_1 = -1-v_2 = -1-v_3 = -1-v_4$$

て提供されうる各巻の一本組を法上提供する。

V_1 、 $L-V_0$ 、 $L-V_1$ 、 $L-V_2$ (1010) 及び V_1 、 $L-V_0$ 、 $L-V_1$ 、 $L-V_2$ (1101) の形態を
 示す共有結合型一本鎖状体を図 1 に示す。非共有結合型パー一本鎖状体 (222) も
 図 1 に示している。

本発明において利用するための一組の抗体フラグメントは任意の沈降の形成及び/又は固相試料とドメインとを結合しうる。好ましくは、その前記と重組可能なドメインは同一の抗原に特異的である。選択されて多価の一価抗体を生成している。同様の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA配列を含むベクターを作るため、これらの局所をエンコードする遺伝子の配列が必要とされる。通常は DNA配列は公共のデータベースから入手するか、又は企業界に已知の塩基の手段によって獲得せざるを得ない。例えば、The U.S. Department of Health and Human Servicesにより公開された National Sequences of Proteins of Immunological Interest 第4版(1991)は、4,100まで述べられている抗原と多くの抗体可変領域の配列を提示している。

遺伝子配列が未知なとき、ベクターの中にクローニングする DNA の断片として、ミ
クロ注射針介成により mRNA から獲得した cDNA 配列を利用することが一般に可能
である。抗体に依して、mRNA の区画は塩基配列にわたるハイブリドマから獲得す
る。例えば、ウサギ ATCC Cell Lines and Hybrids, American Tissue C

Store Collection, 20300 Park Ave Drive, Rockville, Md., USA (1990) を参照のこと、その中に提供されている幅広い様々な抗体と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用である。これらの細胞系及びその他の細胞の細胞が、ドメインをコードするmRNAの融合として、又はモノクローナル抗体生体のアミノ酸配列を決定するために抗原タンパク質を産生するように利用可能である。

抗体の付着領域は、適当な可溶性配糖体、通常は家畜動物としてみても好都合にはマウスを免疫することにより得られる。その免疫原は問題の抗原であるか、又はハプタンであるか、キーホールリンゴットヘンシアン(AHL)の特定の抗原に対するこのハプタンの抗原性複合体であろう。免疫原は宿主細胞への適当な2〜3週間置きに免疫原的又は抗原の繰り返し注射によって好適に実施される。通常、最後の免疫の3日後、脾臓を摘出し、そしてmRNAを当業界に公知の標準手順により簡単に産生できるようにハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する細胞株へと移植する。

抗原の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV_H及びV_Lドメインは好ましくは、1980年2月3日に公開されたPCT出願 NO 90/04410 及び1988年1月26日に公開されたPCT出願 NO 89/00592 に開示されている、免疫細胞タンパク質222領域に対する一連のCC領域の一つから獲得される。より好ましいのは、PCT出願 NO 90/04410 及び NO 89/00592 においてCC49と記載されているモノクローナル抗体に由来するV_H及びV_Lドメインである。CC49のV_Hをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Lのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Hをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図4に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Lをコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図5に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及びその一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V_HとV_Lドメインを連結するための適

当なリンカーは、V_HとV_Lドメインが、一本鎖ペプチドであって完全抗体のもとに誘導に導かれる二次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが形成している完全抗体の結合能力を保持しているペプチド鎖へとつながったことを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、モノクローナル抗体フラグメントのV_H及びV_Lドメインが二次元構造であって、その各フラグメントが、そのモノクローナル抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。高量の特徴を有するリンカーは、その結合特性を有することによって本明細書に記述される本発明の抗体4.5.6.7.8.9.10.11.12.13.14.15.16.17.18.19.20.21.22.23.24.25.26.27.28.29.30.31.32.33.34.35.36.37.38.39.40.41.42.43.44.45.46.47.48.49.50.51.52.53.54.55.56.57.58.59.60.61.62.63.64.65.66.67.68.69.70.71.72.73.74.75.76.77.78.79.80.81.82.83.84.85.86.87.88.89.90.91.92.93.94.95.96.97.98.99.100.101.102.103.104.105.106.107.108.109.110.111.112.113.114.115.116.117.118.119.120.121.122.123.124.125.126.127.128.129.130.131.132.133.134.135.136.137.138.139.140.141.142.143.144.145.146.147.148.149.150.151.152.153.154.155.156.157.158.159.160.161.162.163.164.165.166.167.168.169.170.171.172.173.174.175.176.177.178.179.180.181.182.183.184.185.186.187.188.189.190.191.192.193.194.195.196.197.198.199.200.201.202.203.204.205.206.207.208.209.210.211.212.213.214.215.216.217.218.219.220.221.222.223.224.225.226.227.228.229.230.231.232.233.234.235.236.237.238.239.240.241.242.243.244.245.246.247.248.249.250.251.252.253.254.255.256.257.258.259.260.261.262.263.264.265.266.267.268.269.270.271.272.273.274.275.276.277.278.279.280.281.282.283.284.285.286.287.288.289.290.291.292.293.294.295.296.297.298.299.300.301.302.303.304.305.306.307.308.309.310.311.312.313.314.315.316.317.318.319.320.321.322.323.324.325.326.327.328.329.330.331.332.333.334.335.336.337.338.339.340.341.342.343.344.345.346.347.348.349.350.351.352.353.354.355.356.357.358.359.360.361.362.363.364.365.366.367.368.369.370.371.372.373.374.375.376.377.378.379.380.381.382.383.384.385.386.387.388.389.390.391.392.393.394.395.396.397.398.399.400.401.402.403.404.405.406.407.408.409.410.411.412.413.414.415.416.417.418.419.420.421.422.423.424.425.426.427.428.429.430.431.432.433.434.435.436.437.438.439.440.441.442.443.444.445.446.447.448.449.450.451.452.453.454.455.456.457.458.459.460.461.462.463.464.465.466.467.468.469.470.471.472.473.474.475.476.477.478.479.480.481.482.483.484.485.486.487.488.489.490.491.492.493.494.495.496.497.498.499.500.501.502.503.504.505.506.507.508.509.510.511.512.513.514.515.516.517.518.519.520.521.522.523.524.525.526.527.528.529.530.531.532.533.534.535.536.537.538.539.540.541.542.543.544.545.546.547.548.549.550.551.552.553.554.555.556.557.558.559.560.561.562.563.564.565.566.567.568.569.570.571.572.573.574.575.576.577.578.579.580.581.582.583.584.585.586.587.588.589.590.591.592.593.594.595.596.597.598.599.600.601.602.603.604.605.606.607.608.609.610.611.612.613.614.615.616.617.618.619.620.621.622.623.624.625.626.627.628.629.630.631.632.633.634.635.636.637.638.639.640.641.642.643.644.645.646.647.648.649.650.651.652.653.654.655.656.657.658.659.660.661.662.663.664.665.666.667.668.669.670.671.672.673.674.675.676.677.678.679.680.681.682.683.684.685.686.687.688.689.690.691.692.693.694.695.696.697.698.699.700.701.702.703.704.705.706.707.708.709.710.711.712.713.714.715.716.717.718.719.720.721.722.723.724.725.726.727.728.729.730.731.732.733.734.735.736.737.738.739.740.741.742.743.744.745.746.747.748.749.750.751.752.753.754.755.756.757.758.759.760.761.762.763.764.765.766.767.768.769.770.771.772.773.774.775.776.777.778.779.780.781.782.783.784.785.786.787.788.789.790.791.792.793.794.795.796.797.798.799.800.801.802.803.804.805.806.807.808.809.810.811.812.813.814.815.816.817.818.819.820.821.822.823.824.825.826.827.828.829.830.831.832.833.834.835.836.837.838.839.840.841.842.843.844.845.846.847.848.849.850.851.852.853.854.855.856.857.858.859.860.861.862.863.864.865.866.867.868.869.870.871.872.873.874.875.876.877.878.879.880.881.882.883.884.885.886.887.888.889.890.891.892.893.894.895.896.897.898.899.900.901.902.903.904.905.906.907.908.909.910.911.912.913.914.915.916.917.918.919.920.921.922.923.924.925.926.927.928.929.930.931.932.933.934.935.936.937.938.939.940.941.942.943.944.945.946.947.948.949.950.951.952.953.954.955.956.957.958.959.960.961.962.963.964.965.966.967.968.969.970.971.972.973.974.975.976.977.978.979.980.981.982.983.984.985.986.987.988.989.990.991.992.993.994.995.996.997.998.999.1000.1001.1002.1003.1004.1005.1006.1007.1008.1009.1010.1011.1012.1013.1014.1015.1016.1017.1018.1019.1020.1021.1022.1023.1024.1025.1026.1027.1028.1029.1030.1031.1032.1033.1034.1035.1036.1037.1038.1039.1040.1041.1042.1043.1044.1045.1046.1047.1048.1049.1050.1051.1052.1053.1054.1055.1056.1057.1058.1059.1060.1061.1062.1063.1064.1065.1066.1067.1068.1069.1070.1071.1072.1073.1074.1075.1076.1077.1078.1079.1080.1081.1082.1083.1084.1085.1086.1087.1088.1089.1090.1091.1092.1093.1094.1095.1096.1097.1098.1099.1100.1101.1102.1103.1104.1105.1106.1107.1108.1109.1110.1111.1112.1113.1114.1115.1116.1117.1118.1119.1120.1121.1122.1123.1124.1125.1126.1127.1128.1129.1130.1131.1132.1133.1134.1135.1136.1137.1138.1139.1140.1141.1142.1143.1144.1145.1146.1147.1148.1149.1150.1151.1152.1153.1154.1155.1156.1157.1158.1159.1160.1161.1162.1163.1164.1165.1166.1167.1168.1169.1170.1171.1172.1173.1174.1175.1176.1177.1178.1179.1180.1181.1182.1183.1184.1185.1186.1187.1188.1189.1190.1191.1192.1193.1194.1195.1196.1197.1198.1199.1200.1201.1202.1203.1204.1205.1206.1207.1208.1209.1210.1211.1212.1213.1214.1215.1216.1217.1218.1219.1220.1221.1222.1223.1224.1225.1226.1227.1228.1229.1230.1231.1232.1233.1234.1235.1236.1237.1238.1239.1240.1241.1242.1243.1244.1245.1246.1247.1248.1249.1250.1251.1252.1253.1254.1255.1256.1257.1258.1259.1260.1261.1262.1263.1264.1265.1266.1267.1268.1269.1270.1271.1272.1273.1274.1275.1276.1277.1278.1279.1280.1281.1282.1283.1284.1285.1286.1287.1288.1289.1290.1291.1292.1293.1294.1295.1296.1297.1298.1299.1300.1301.1302.1303.1304.1305.1306.1307.1308.1309.1310.1311.1312.1313.1314.1315.1316.1317.1318.1319.1320.1321.1322.1323.1324.1325.1326.1327.1328.1329.1330.1331.1332.1333.1334.1335.1336.1337.1338.1339.1340.1341.1342.1343.1344.1345.1346.1347.1348.1349.1350.1351.1352.1353.1354.1355.1356.1357.1358.1359.1360.1361.1362.1363.1364.1365.1366.1367.1368.1369.1370.1371.1372.1373.1374.1375.1376.1377.1378.1379.1380.1381.1382.1383.1384.1385.1386.1387.1388.1389.1390.1391.1392.1393.1394.1395.1396.1397.1398.1399.1400.1401.1402.1403.1404.1405.1406.1407.1408.1409.1410.1411.1412.1413.1414.1415.1416.1417.1418.1419.1420.1421.1422.1423.1424.1425.1426.1427.1428.1429.1430.1431.1432.1433.1434.1435.1436.1437.1438.1439.1440.1441.1442.1443.1444.1445.1446.1447.1448.1449.1450.1451.1452.1453.1454.1455.1456.1457.1458.1459.1460.1461.1462.1463.1464.1465.1466.1467.1468.1469.1470.1471.1472.1473.1474.1475.1476.1477.1478.1479.1480.1481.1482.1483.1484.1485.1486.1487.1488.1489.1490.1491.1492.1493.1494.1495.1496.1497.1498.1499.1500.1501.1502.1503.1504.1505.1506.1507.1508.1509.1510.1511.1512.1513.1514.1515.1516.1517.1518.1519.1520.1521.1522.1523.1524.1525.1526.1527.1528.1529.1530.1531.1532.1533.1534.1535.1536.1537.1538.1539.1540.1541.1542.1543.1544.1545.1546.1547.1548.1549.1550.1551.1552.1553.1554.1555.1556.1557.1558.1559.1560.1561.1562.1563.1564.1565.1566.1567.1568.1569.1570.1571.1572.1573.1574.1575.1576.1577.1578.1579.1580.1581.1582.1583.1584.1585.1586.1587.1588.1589.1590.1591.1592.1593.1594.1595.1596.1597.1598.1599.1600.1601.1602.1603.1604.1605.1606.1607.1608.1609.1610.1611.1612.1613.1614.1615.1616.1617.1618.1619.1620.1621.1622.1623.1624.1625.1626.1627.1628.1629.1630.1631.1632.1633.1634.1635.1636.1637.1638.1639.1640.1641.1642.1643.1644.1645.1646.1647.1648.1649.1650.1651.1652.1653.1654.1655.1656.1657.1658.1659.1660.1661.1662.1663.1664.1665.1666.1667.1668.1669.1670.1671.1672.1673.1674.1675.1676.1677.1678.1679.1680.1681.1682.1683.1684.1685.1686.1687.1688.1689.1690.1691.1692.1693.1694.1695.1696.1697.1698.1699.1700.1701.1702.1703.1704.1705.1706.1707.1708.1709.1710.1711.1712.1713.1714.1715.1716.1717.1718.1719.1720.1721.1722.1723.1724.1725.1726.1727.1728.1729.1730.1731.1732.1733.1734.1735.1736.1737.1738.1739.1740.1741.1742.1743.1744.1745.1746.1747.1748.1749.1750.1751.1752.1753.1754.1755.1756.1757.1758.1759.1760.1761.1762.1763.1764.1765.1766.1767.1768.1769.1770.1771.1772.1773.1774.1775.1776.1777.1778.1779.1780.1781.1782.1783.1784.1785.1786.1787.1788.1789.1790.1791.1792.1793.1794.1795.1796.1797.1798.1799.1800.1801.1802.1803.1804.1805.1806.1807.1808.1809.1810.1811.1812.1813.1814.1815.1816.1817.1818.1819.1820.1821.1822.1823.1824.1825.1826.1827.1828.1829.1830.1831.1832.1833.1834.1835.1836.1837.1838.1839.1840.1841.1842.1843.1844.1845.1846.1847.1848.1849.1850.1851.1852.1853.1854.1855.1856.1857.1858.1859.1860.1861.1862.1863.1864.1865.1866.1867.1868.1869.1870.1871.1872.1873.1874.1875.1876.1877.1878.1879.1880.1881.1882.1883.1884.1885.1886.1887.1888.1889.1890.1891.1892.1893.1894.1895.1896.1897.1898.1899.1900.1901.1902.1903.1904.1905.1906.1907.1908.1909.1910.1911.1912.1913.1914.1915.1916.1917.1918.1919.1920.1921.1922.1923.1924.1925.1926.1927.1928.1929.1930.1931.1932.1933.1934.1935.1936.1937.1938.1939.1940.1941.1942.1943.1944.1945.1946.1947.1948.1949.1950.1951.1952.1953.1954.1955.1956.1957.1958.1959.1960.1961.1962.1963.1964.1965.1966.1967.1968.1969.1970.1971.1972.1973.1974.1975.1976.1977.1978.1979.1980.1981.1982.1983.1984.1985.1986.1987.1988.1989.1990.1991.1992.1993.1994.1995.1996.1997.1998.1999.2000.2001.2002.2003.2004.2005.2006.2007.2008.2009.2010.2011.2012.2013.2014.2015.2016.2017.2018.2019.2020.2021.2022.2023.2024.2025.2026.2027.2028.2029.2030.2031.2032.2033.2034.2035.2036.2037.2038.2039.2040.2041.2042.2043.2044.2045.2046.2047.2048.2049.2050.2051.2052.2053.2054.2055.2056.2057.2058.2059.2060.2061.2062.2063.2064.2065.2066.2067.2068.2069.2070.2071.2072.2073.2074.2075.2076.2077.2078.2079.2080.2081.2082.2083.2084.2085.2086.2087.2088.2089.2090.2091.2092.2093.2094.2095.2096.2097.2098.2099.2100.2101.2102.2103.2104.2105.2106.2107.2108.2109.2110.2111.2112.2113.2114.2115.2116.2117.2118.2119.2120.2121.2122.2123.2124.2125.2126.2127.2128.2129.2130.2131.2132.2133.2134.2135.2136.2137.2138.2139.2140.2141.2142.2143.2144.2145.2146.2147.2148.2149.2150.2151.2152.2153.2154.2155.2156.2157.2158.2159.2160.2161.2162.2163.2164.2165.2166.2167.2168.2169.2170.2171.2172.2173.2174.2175.2176.2177.2178.2179.2180.2181.2182.2183.2184.2185.2186.2187.2188.2189.2190.2191.2192.2193.2194.2195.2196.2197.2198.2199.2200.2201.2202.2203.2204.2205.2206.2207.2208.2209.2210.2211.2212.2213.2214.2215.2216.2217.2218.2219.2220.2221.2222.2223.2224.2225.2226.2227.2228.2229.2230.2231.2232.2233.2234.2235.2236.2237.2238.2239.2240.2241.2242.2243.2244.2245.2246.2247.2248.2249.2250.2251.2252.2253.2254.2255.2256.2257.2258.2259.2260.2261.2262.2263.2264.2265.2266.2267.2268.2269.2270.2271.2272.2273.2274.2275.2276.2277.2278.2279.2280.2281.2282.2283.2284.2285.2286.2287.2288.2289.2290.2291.2292.2293.2294.2295.2296.2297.2298.2299.2300.2301.2302.2303.2304.2305.2306.2307.2308.2309.2310.2311.2312.2313.2314.2315.2316.2317.2318.2319.2320.2321.2322.2323.2324.2325.2326.2327.2328.2329.2330.2331.2332.2333.2334.2335.2336.2337.2338.2339.2340.2341.2342.2343.2344.2345.2346.2347.2348.2349.2350.2351.2352.2353.2354.2355.2356.2357.2358.2359.2360.2361.2362.2363.2364.2365.2366.2367.2368.2369.2370.2371.2372.2373.2374.2375.2376.2377.2378.2379.2380.2381.2382.2383.2384.2385.2386.2387.2388.2389.2390.2391.2392.2393.2394.2395.2396.2397.2398.2399.2400.2401.2402.2403.2404.2405.2406.2407.2408.2409.2410.2411.2412.2413.2414.2415.2416.2417.2418.2419.2420.2421.2422.2423.2424.2425.2426.2427.2428.2429.2430.2431.2432.2433.2434.2435.2436.2437.2438.2439.2440.2441.2442.2443.2444.2445.2446.2447.2448.2449.2450.2451.2452.2453.2454.2455.2456.2457.2458.2459.2460.2461.2462.2463.2464.2465.2466.2467.2468.2469.2470.2471.

して多量からより迅速に溶解される。

溶解及び/又は治療用油のため、この多量の一価抗体は1又は複数の抗体フラグメントが併時的に存在して両剤性であるように、及び/又は改変の抗体フラグメントが併時的もしくは治療因子に対して特異的であるように物結せらる。

本発明は更に、癌の増殖の阻害及び/又は治療において有用な特性を好適な薬理活性をも考慮しており、ここでこの増殖阻害はしばしば細胞の増殖上で検出される。診断及び/又は治療用油のため、この多量の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療時に治療に公知の方法によって融合せらる。本発明の薬理活性は当業界に公知の方法、例えば電泳の検査、電泳又は凝集沈降工程によって測定される。

本発明を、その単なる例示を含む以下の真価例の考慮により更に明かかにする。

例 5

RF17 5-ゾロセー4-チコロ-3-インドノルホスフェート

RF 塩基対

His-Trisアロパン (1, 3-ビス(トリス(ヒドロキシメチル)-アミナルアミノ)フロパン)

BSA 牛血清アルブミン

CR 細胞性決定試験

ELISA 酵素結合免疫吸着アッセイ

Fig 表紙一本鎖RFダイマー

IF 等電点電気泳動

Isp 牛血清白

LD Loria Dextra; 製造

Mab モノクローナル抗体

MS 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸

RF 分子重

SDT ニトロフルオロエタノール/グリセロール

オリゴ オリゴヌクレオチド

FAE ポリアクリルアミドゲル

FACE ポリアクリルアミドゲル電気泳動

FES リン酸緩衝液

FCR ポリメラーゼ連鎖反応

pSOF 62PFをコードする DNA配列を含むプラスミド

SIES ラジオイムノグノド外科

ET ラジオイムノ治療

scFv 一本鎖バクテリオファグリンフラグメントモノマー

scFvs 共有結合した一本鎖バクテリオファグリンフラグメントダイマー

SBS ドデシル硫酸ナトリウム

TBS トリス緩衝液

トリス (トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)

TTBS ウィーン20次溶液

V_h イムノグロブリン重鎖可変ドメイン

V_L イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

試験

CE49: ヒト肺がん細胞タンパク質72(FA6-72)に特異的なモノクローナル抗体: ATCC No. 8455として提供。

CE49AB: 重鎖のN-末端領域に結合している完全抗体より成るCE49の抗がん細胞抗体。

CE49scFv: ペプチドリッパーにより産生されているCE49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CE49v2: ダイマーを構成するように共有結合している2つのCE49scFv。Figの表紙の表紙は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば: CE49v2は六量体の多量体を意味する。

CE49scFv2: 3つのリンカーにより連結されている、2本のCE49v1ドメインと2本のV_hドメインとより成る共有結合一本鎖抗体フラグメント。V_h(L)とV_h(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LHLH, LHLH, LHLH, HLHL, HLHL及びHLLH。

プラスミド

pSCFV-UBP: 22のアミノ酸リンカーにより連結されている、CE49の可変領域とCE49の重鎖とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

pSCFV-UBP-p9111: CE49scFv2 LHLH又はHLHL中成動のそれぞれを産生するためのコード配列を含むプラスミド。

表紙例

一般試験

分子クローニングのための手順は、その内容内容を引用することによって本明細書に組み入れ、Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 2版(1989)及び Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992)に記載の手順である。

ここで用いた水は全て超イオン交換水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び溶解

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、塩のジ-シアノエチルホスホリミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 381 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の所産物は、濃硫酸アンモニウムの中で55℃で6-15時間加熱することにより除去した。濃硫酸アンモニウムはエペレーションを介して除去し、そしてその塩基化合物を30-40μlの蒸留水の中に再溶解させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲルでの電気泳動の際、オリゴを緩衝液(1X)を用いて可溶化した。FABバンドをゲルから切り出し、そして1μlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのDTAの中で低圧で2時間かけて凍結させた。最終乾燥は、DNAをSev-Tac(西澤)C-18カラム(Millipore, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで洗脱させることによって行った。その洗脱の体積を約3mlに下げ、そしてDNA濃度を250nm(OD₂₆₀)での光学密度を測定することにより決定した。

細胞培養条件

細胞培養は全て、Bellows Research Laboratories (Gaithersburg, MD)。

New England Biolabs, Inc. (Goverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BN, Indanapolis, IN)の酵素及び試薬を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。溶菌させた細胞物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをニチウムブロムドで染色し、そのDNAバンドを短波紫外により照射させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、25mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ(Calco Carbide Corp., Chicago)の中に入れた。そしてMax Sommer電気泳動装置(Boehr Scientific Instruments, CA)を用いて凍結させた。ランブル電圧を500V; 濃度約(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノールに沈ませ、そして凍結水中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら、Can. Res., 46, 850-857 (1986)に従って厳密に追従して調整したFA6-72細胞を、ポリビニルクロリド36穴マイクロタイフプレート(Costar Laboratories, Inc., Charlotte, NC)のウェルの上に一夜培養させることで培養させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで30℃で1時間ブロックし、次いで200μlのPBS、0.05%の Tween 20で3回洗った。25μlの抗原抗体及び25μlのビオチン化CE49(1/20,000倍率の1mg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを30℃で30分インキュベートした。プレートに結合したFA6-72、ビオチン化CE49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの増幅、及び発色時は、余剰な抗体又はビオチン化CE49がないように、しかしscFvによる結合を測定するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5μg/mlのCE49及び10μg/mlのCE49Abとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び/又はLHとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの陽性コントロールは1:1000の花柳のストレプトアビジン50μl(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを30℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50μlのパラニトロフェニルホスフェート溶液(Sirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして発色反応を最低20分待った。scFv結合の相対量をマイクロプレートリーダー(Mo-

regular Devices Corporation, South Park, CA)を用い100-150 nmでの光干渉スキャニングにより測定した。scfv2の場合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の割合の低下をもたらした。

SPS-PA65及びウェスタンブロッティング

SPS-PA65は分析のためのサンプル(20 μ l)を、非還元型サンプル製法バッファ(Septra)1(Integrated Separation Systems135), Hattick, VA)の中で5分間煮沸することにより調製し、そして、0-20%のギザリソルミエール(Bio-Liquid)にその製造者の仕様書(155)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(155)を用い、ゲル当たり55mAで、一電の電流で45分間行った。ゲルをナジグーブリザントブルーR-25(Bio-Rad, Richmond, CA)の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子重量標準は予め定められており(Mid Range kit, Diversified Bio-tech, Newton Center, MA),そして下記のコンプラグを含む：ホスホリラーゼB、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オパールミン、ラクトアトデヒドロゲナーゼ、乳酸アンヒドラーゼ、ヨウ化グルタミル及びチクロロムC。対応の分子量はそれぞれ65,000, 55,000, 43,000, 36,000, 29,000, 18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュブリザントのゲルも移動した。電気泳動後、ゲルの一方を製法バッファ(10.3Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15-20分平置した。Immobilon-P-PVDF(ポリビニルデンジクロリン)膜(Millipore, Bedford, MA)をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に製法バッファ(10.3Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で3分平置した。Millipore-SDE装置(Millipore社)を、ゲルの中のタンパク質をその膜に転写するために用いた。一滴の製法バッファを1を隔てて膜の中央に落とした。Whatman 3MM 濾紙のシートを製法バッファで1の中に浸し、そしてその乾燥面の上に滑らかに置いた。製法バッファを2(25mM)のトリス, pH10.4)の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、半滴のゲルをその上に置き、そして再度に製法バッファ(40mMのグリシン中の0.5Mのトリス-HCl, pH9.4)の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mVの定電流で、初期電圧は8-20ボルトに調整した)を用いて30分で進められた。

通常のプロトコルに異なったが、ただし製法バッファとして、0.1Mのクエン酸ナトリウム, pH 2.6を加えた。固相を、1.0Mのトリス-HCl, pH 9.0を用いてpH7に中和した。ビオチニル化試薬は下記の通りに設定した。FA19 14(1 μ g、水の中で100 μ l)を100 μ lの0.1MのNaCl, pH 9.0と混合した。ビオチニル化アミノノカブロン酸-N-ヒドロキシスチレンジエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mM)を0.5mlのジメチルスホルミドの中に溶かした。Biotin-X-NHS溶液(20 μ l)をFA19 14溶液に加え、そして22℃で4時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Fluorene Sephadex 12 HR10/20カラム(Pierce-Warriner, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.3 μ l/minの流速で、ビオチニル化FA19 14は16.8minのピークで洗脱した。このピークを凍結する両分をプールし、そして4℃で保存し、そしてCC49及びYvC28により検定されるCC49イディオタイプを検出するのに用いた。

電気泳動及び染色(EF)

電気泳動(EF)は、P95743(Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITERという名のコンピュータプログラムを用いて行われた。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIを加えて陽極が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計算はCに調整した。45 μ lはそれぞれ全てがグルタマール結合に隣り合うからである。

実験にpIを、Isagelアガロース(EFブリーフ, 10003-10)(FMCbioProducts, Rockland, ME)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、EFを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、50Vボルト(陽極)、20mAの電流及び10Wの定電電力とした。電気泳動後は90minで完了した。EF溶液はBioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、ヨーグルトグリブリンB、ホスホゲンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬(オグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レンタルレクシン及びチクロロムCを含む。それらの量は1.65, 3.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00及び8.20及び9.50である。ゲルを、PBCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

CC49抗体の電気泳動

プロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのソルッキング溶液(トリス緩衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO)を含有する)の中に入れた。TBSはPierce Chemical(Rockford, IL)より、予備材料会社として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は250mlのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を提供する。これらの膜を約1時間、室温でブロックし、そして2mlづつ0.5%のツインX洗浄液(TTBS)を用いて5分間を回した。TTBSを調整するには、0.5%のツイン20(Sigma)をTTBSのリッチー当り混合した。使用したブローブ抗体は20mlのビオチニル化FA19 14溶液とした(10 μ g/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTTBS当り1gのBSAを加えることにより作られた。所調温度で30-60分ブローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を室温で30-60分、洗剤バッファの中で1:500希釈のアルカリホスファターゼの混合されたストレプトアビジン(Southern Biochemical Associates, Birmmington, AL)20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この洗剤を洗った。発色反応の前に、膜を緩衝アルカリバッファ(20ml)の中で2分洗った。このバッファは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1MのNa₂HPO₄, pH 9.2とした。アルカリホスファターゼについての留意を添えた。ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(Sigma)を70%のジメチルスホルミドの中に溶かした。ニトロブルーテトラゾリウム-N-インドールホスフェート(BCIP)(Sigma)を別に100%のジメチルスホルミドの中に溶かした。5-ブromo-4-クロロ-3-インドールホスフェート(BCIP)(Sigma)を別に100%のジメチルスホルミドの中に溶かした。これらの溶液も、Pronectaよりウェスタン染色剤として市販されている。染色のため、それぞれ120 μ lを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色液からそれらを水で洗い流した。

ビオチニル化FA19 14

FA19 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10225として寄与されているネズミの抗-イデオタイプ抗体(1624, Kアインタイプ)である。FA19 14をNygene Protein Aアフィニティカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。3

1g5. scfv2の糖および非糖結合部を含む糖基化CC49抗体はすべて、含有している1.3 μ m光路長の石英顕微鏡(HeNe)およびPerkin-Elmer UV/VIS分光光度計550型を用いて、タンパク質12%の280nm波長の吸光度を測定して定量化した。モル吸光係数(E_{1%})は、抗体について、下記式を用いて測定した。

$$E_{1\%} = (Tyr数) \times 5,500 + (Trp数) \times 1,340 - ((Cys) 2数) \times 150 - (Pro数) \times 10$$

これらの値は、B.B.Wallander, Advances in Protein Chemistry, 17巻, 375-378頁に記載されている情報に基づいている。

高性能液体クロマトグラフィー

scfv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にタンパク質またはチクロロム緩衝液を用いたLEE 5PLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLポンプ、2152型流動相、2150型の吸光度に設定されたUV CONE 5D 2238型検出器および2511型 SuperRac fraction collectorに構成されている。

サブユニットのPBCによる製法

ポリメラーゼ鎖反応(PCR)はすべて、150 μ gのプログラム(pg)のプラスミド(1) (pSG4510) ; 100 μ gのプライマー ; 1 μ lのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーワーク)所在のPEC社)のAmpli-Taqポリメラーゼ ; 1 μ lの10mM dNTPおよび10 μ lの10 μ M MgCl₂ (両者ともにPEC社に提供されている) ; ならびに合計容積を100 μ lにするのに充分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はノーワーが定温しているのとほとんど同時に進行した。これらの反応は、PBC 9600サーモサイクラー(thermoFisher)を用いて36サイクルを行ったが、その1サイクルは、94℃で20-45秒間のDNAの融解 ; 50-60℃で0.5-1.5分間のアニーリングおよび72℃で0.5-2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(オカ、カリフォルニア州、ホスター・シティア所在)の3300型もしくは44561型 96孔板で混合し、次いで上記のようにして精製した。

リゲーション

100%のパッケージおよび対応する：1）生産業者の当分のインポート OKA
を用いるリセプション反応を、Stratagene社（米国、カリフォルニア州、ラ・フ
ニャ市）の 104 株のライゲキットを用い、遺伝子コードの表示にしたがって行っ
た。リセプション反応の（全容第 2 巻）は最初 18°C でインキュベートし、次い
て 4°C で 7 日まで待たずに冷めた。

形質面。

形質転換は、100μlのS11stratagene社の大腸菌 (E.coli) AG1コンピアント細胞 (米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ研究所のS11stratagene社) を用い、メーカーの指示に従って行った。上記リゲーション反応後宿主菌の増殖(1〜5μl)を使用した。形態異常ステップの他、細胞は、適合を認めるかもしらフラスコ(1)を用いて37℃で14時間増殖させて、続いて、pSCFV10-p49IL2もしくはp49IL2に用いる26×69μmのクロラムフェニコール含有(CM262)セルリア媒体上にブレイクし、またはファスミ(Fp633)に含有するアロートもしくはpS1391由来のその他の核融合剤に用いる、100μg/mlアンピシリン(AMP10C)セルリア媒体(ブレイク)(LB+AMP10C)上にブレイクした。

太陽系クローンのスクリーニング

銀色プラスミドは、Promega社（米国、ウィスコンシン州、マディソン所在）の Magicミニプレッププラスミド製法キットを用いて、塩法圧（selection pressure）を維持するため適切な濃度を含有するLBプロセス培養液からは離した。このキットはメーカーの取扱説明書にしたがって使用した。

ブラスミドで検索

pH4.0および pH5.3と命名された2種のプラスミドを、多数の一本鎖抗体を製造するために構築した。pH4.0型を含有する宿主菌株は、 V_H -L V_H -L V_H -L V_H と表すことができるポリペプチドを産生した。ここで V_H と L_V は125A抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー(L)は、F2E SEQ ID NO: 5の配列を有する塩基のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-
Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asu-Leu

§ 49LEMLを含有する荷主距離は、 $V_1 - L_1 - V_2 - L_1 - 7_2 - L_1 - V_3$ で表すことができる

示した。陽性プローブであり、かつ *hsc70* および *hsc72* による消化効率の 20% 程度の制限酵素断片 (図 9) に対する 95%-2.85% の塩基対 (bp) を含有するクローン を pS1301 と命名し、改めて C494Y 変異を有するシレクノイド配列を含有する pS1302-RT を構築するに選定した。The *hsc70*-*hsc72* ユニークシーケンスを pS1301 中に挿入した後は、その *hsc70* と *hsc72* の両方のポリシリコン塩基中に含有する *hsc70* 制限酵素のシレクノイドアーゼ塩基を除くためであった。このことは、*hsc70* 塩基が、標識体中に各標記 Y 塩基を配置するのにユニークである必要がある (*hsc70* と *hsc72* の領域を併用して構築するため) 計された。各 Y 塩基が *hsc70* と *hsc72* 塩位に附加されると、*hsc70* は各塩位に破壊されて、ユニーク断片片に入ってくる *hsc70* 塩位を喪失した。

V₃ 配列は、FCR 塩基の標的として pSCF7 JM を用い、オリゴの 5' SCPI と 3' オリゴ SCPI によって FCR で作製した。SCPI に対する DNA 配列 (SEQ ID NO: 10) と SC3 に対する RNA 配列 (SEQ ID NO: 11) は次のとおりである。

SDS1 : 5' -TAA CTC CAG GTT CAG TTC CAG CAG-3'

5095: 5' -TAA GGT AGC ACCA ACC GAT TAG TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT-3'

下側をつけた部分にエンドメクレノーズ制限部位を示す。

増幅された V_0 BSA を、4% の 2-G 、塩化銅、エタノールによる沈澱および 20 mL 以上の水への溶解によって精製した。その V_0 配向を 2MeI と 2MeI の混合物で消化し、同じ反応剤系で消化されずに得られた $\text{P}(\text{SiMe}_2\text{Et})_2$ ベクターに對するインターンとして用いた。増幅のグーテンシュタイン反応を行い、次いで一級分 (4 mL) を含むコンピテント人筋運動 1 mL 組成を形成させた。形成に伸張された塊型を、 1M NH_4OAc 透析フット上にプレースした。CGMP、イソトンを生育していることを示す藍紫クロマトを MeI および 2MeI 消化スクリーンから抽出した。

United States Mechanical (USM) 社（米国、オハイオ州クリーブランド所在）の Sequence Eil、および配列決定用プライマー pSL301SEQ (pSL301ベクター中の Eil 1 部位から 57bp 上流においてアームした 11bp の配列決定プライマー) と、CGATGG を用いて、Eil の配列決定を行って、(45%) の配列を得た。pSL301SEQ 中の CAGTTC を Eil の配列をずらすシーンを明らかにした。この結果、下は

ポリペプチドを産生した。こゝでV₁とV₂はC肽合成の酵素と垂腺の可変部分であり、おとびしは上記アミノ酸配列を有するペプチドリングである。

CCGG, Lys-Lys-Lys (p49.3LH) のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 6) とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7) を図 6 に示す。(497-Lys-Lys-Lys (p50.4LH) のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8) およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9) を図 7 に示す。

PSL3011100000

pSL2013の構造を図8に示す。バクテリオファージ ϕ 243 (Bacillus licheniformis)のペニンシリンG-P (penN) ターミナルドメインを、 Δ 101とよびBa Δ 11で45分間消化したとき、4.5%ポリアクリルアミドゲルから回収し、電気泳動を行った後、4.5%ポリアクリルアミドゲルから回収し、電気泳動させ、エタノールで洗滌させ、次に、同様に処理されたペニンサー (Δ 333) (半田、カワバタニエフ、サンディエゴ所在のInvitrogen社) の同じ位置に標識した。pSEFV13の発出手段は、1992年12月1日付けの米特許第7,925,625号に記載されている。なおこの出願の優先権主張は本稿に適用するものである。

段に、pSEFV13、p3aB、p3aBプロモーターのクロノメトリ配列; 2019年11月4日現在; c4497、緑斑; Bim1制御領域; 255塩のA/T富みのランカー; 図9; Bim1制御部位; c4349、緑斑; Bim1制御部位; pSEFV13プロモーター; およびp3aB11制御部位を含有している (図8参照)。このp3aBプロモーターとp3aBターミナーは、Berres et al. Biol. Chem., 258巻、1211-1215頁、1983年に記載されている。

上記のラジゲーション反応物の一部(3 μL)を、LB+AMP100μg/mLプレート上に
ブロットし、4℃で1夜固定させたコンテントリボソール(4)電極を電圧降下するの
に用いた。ac2Pターミネーター、インサートを含むポテンシアルコントロールを
、Pharmacia(米国)、メラナード社、ガイスターバーク社)の T1 Quickly
rise 11P DNA電極セットと、Bulowwetsら、Nucleic Acid Research, 17巻、452
頁、1989年に記載されているマイクロ波によるコンテントリボソールを用いてス
クローニングした。プロプライエタリー-Nbr 1-B-DNA1-ターミネーターファ
クトリ自体が、*Deoxyribose* 5'末端によって修飾される指示により滅菌ス
クローニングに用いた。

Fig. 30: - TBLTおよびNLSOL-FITの両方を横軸すると自の出発点で使用した。使用した座標は未知のオリゴをここに示す。

PL30152R(SBQ ID NO: 12) および C497. (SBQ ID NO: 13) のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

*SI 2015093 - 5' 806 T00 647 TAP 624 492 TTA 3

CCAGTTP : 5' -GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG 3'

图 11-1 2121.HMI 的构造

PS-J3DHTE (5 μg) を出発物質として用い、これに Rm47阻害および R1+で消化し、大きい方のペプターフラグメントを精製した。CE49% 抑入フラグメントは、5'オリゴとして SCFGE を用い、かつ 3'オリゴとして SCFE を用い、PCRによって複製した。SCFGE のヌクレオチド配列 (Seq 13, 14) は下記のとおりである。

SEQUENCE: 5' -TAAA TGG GCA GAT GAG GCA AAG AAA GAG GCA GCT AAA AAA GAG GAT
 GGC AAA AAG CAT GAG GGC AAG AAA GAT GTT GAG GTT GAG TTG CAG CAG
 TTT-3'

またオリゴ SCFEBはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14)のbp 6 ~ 76)を含有している。rSCFEB(EM中のSC493)的でアニールするよう設計されたオリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp 77 ~ 90向きのものである。

下鎖をつけた配座は $7\text{sp}1$ 型空に相当する。開かれた PCG インターを構築し、 $7\text{sp}1$ と $\text{Ibe}1$ で満足し次いで $\text{ps}3\text{p}127$ $5\text{acc}7\text{I}7$ - $\text{Ibe}1$ ペアとこの I ジョイン反応に用いた (図 1)。互に配座した大環 DNA: 細糸を、そのリダクション反応 (3.5.1) で環化させるを行うのに用い、 $\text{Ibe}1\text{p}127$ $\text{Ibe}1$ 系 I インターにブレイクした $\text{ps}3\text{p}127$ I 生成物を示す正しい大きさの $\text{Ibe}1$ - $\text{Ibe}1$ インターを有する 2 個のクロソンの配座を有する I クロソンを以て決定し、正しい型 (図 2) カタレオドナ [124-1543] を有する I クロソンをその後の構築に用いる。ここで、 $\text{SPT}1$ のカタレオドナ型 (SPT 11.1): 15) は下鎖のとおりである。

SOPI : 5' -TG ACT TTA CGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカー-V、サブユニット (bp1344~1661, 図7) は、5' オリゴの S
CpHと3' オリゴの SCF2を用い、かつ PCRの補助として、pSCF VHDを用いて増殖

で 20M トリス-HCl pH 7.6 ± 0.5, NaCl を含む何れもプログラムを、1.5μl/μl の濃度で使用した。両菌の生産物は、狭い 3% SDS-PAGE 凝胶で分離し、各 4 泳路に 10μl ずつを泳走させた。この泳走の成分は、二つの SDS-PAGE ゲルによる泳走で、一方のゲルはターミネーターリリアントゲル-2350 で染色し、他方のゲルはエタンスタン法 (アロパゲル法) でギオンアルブミン PAID 14 を使用し、染色された。scv22 (LJ28) は LPS の糖 C 糖基分析の標準品で、56,239 Dalton の質量に出現した。活性成分は生色発色し、59nm 405 nm 光に対して一吸光値を示し、改めて Pharmacolocalization 試験によるカタン交換法に証明した。この結果はメソフィルの細胞膜の二つの成分からなる、SDS-PAGE などを用いた SDS-PAGE 法による結果、細胞膜の脱離が開始される直前に放出された。したがってこれらの四成分は膜にはカタンに結合してはいなかったわけである。したがって成分 5 と 6 はカタンに結合するために存在した。

None 3 のラムを他 None 5 個分について再使用したが伸出した繊維量は約 20 トンに 1 匹 4 匹であり、流量は 0.32 l/分に低下させた。生産者 3 のラムとの結合なしで放出されたが、None 3 に残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は 5 ～ 6 分間かかった。この処理を行った後、生成物は気中でより迅速の乾燥促進のために野置した。

等電點電泳泳動

標定物の等電点 (pI) は DNASTAR社 (米国、ウイスコンシン州、マディソン所
在) のコンピュータプログラム Protein-Lite[®]を使用して予測した。アミノ酸
組成、およびpI値に基づいて計算した。

試験では、plは、PNC Bioproducts社（米国、メーン州、ロックランド市）の15mL 10F管（10F管は図2～10を参照して特定した。上記10Fを表現するもの、に、Biorad社（米国、カリフォルニア州、ヘッチャング市）の電泳移動装置を用い、上記メーカーの指示にしたがって使用した。その電泳移動の時間は、70msecで500V（限定）および一定電力の10Fであった。電泳装置電圧波形は30分間で完了した。Biorad社の10F電泳装置は、フロッカシアン、タラントグラブ、シカゴベニクニアン、ドラードー、ヒコカルバニクニアン、ドラードー、アマミカ、ポリメン、トヘネン、プロメン、C、1.6のヒラメン、ニクニアンおよびシカゴベニクニアン。

Cに与えられ、 P_{12} はそれぞれ、5.3、5.13、6.09、6.53、7.03、7.35、7.8、8.0、9.20 および 9.6 にあった。ゲルは1%の指示にしたがって紫色に染まった。XASTAR プログラムによって両方の λ の2の位の差として、5.1の倍か削減された。既製の生成数に対して第一および二バンドがゲル上に、両者の間の0.5の位置にくらべられた。

Fig. 5c(2) (1.51および1.53) のような精製試料では、280nm波長光の吸光度を分光学的に測定することによって定量化した。その吸光度係数値は、各々、先に引用した Weillauerの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、C249scfγ2(LIL), C249 scfγ2(LHL)およびC249scfγ2のE¹¹⁸ (230aa) 数はそれぞれ、1.43、1.65、1.65 および1.71であった。

实施例 1

CC49sCrFe2の相のLEIとLEIIの相対活性を、126および1000大気圧にFLAGベプチドを有する甲型鉄sCrFe型と比較した。

パーセント競合(percent competition)を下記式によって LISA のデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ値合 試験採取値 (30 405-45mm)}}{\text{ゼロ値合 - 100\% 値合}} \times 100$$

“ α 阻合 (steric competition)” 値は、1 例 854 をジオニル化 (C40 (3×10⁻⁴ mol) と 1 : 1 比率で混合して測定し、一方 130% 結合率はジオニル化 (C40) と混合した C21 (160⁻⁵ μg/mL) 試料に基づいたものである。これらのデータは 11 に示す。試料の蛍光強度は 450nm - 550nm で測定した。3 回の取り戻り率の不平均を応用した。最初に試料 (25 μL) を、TAG-72 コーティングしたマイクロリットルプレートに、1.0×10⁻¹⁰ mol の結合単位/mL で塗布した。ジオニル化 C40 (4 μg/g_μl : 1.0×10⁻¹⁰ に希釈、25 μl 使用) で試料を 1/2 濃度希釈した。反応を抑制 (1 : 2) を行った。両方の形態の surf 2 は 16 に示す (図 11 参照)。別の試験は、C40C8 型単合体を Pab フラグメントと比較した。両者は一価であるが、これは TAG-72 に対する結合の親和性が高いことを示した。これらの結果は、有価な二つの結合の両方の形は、二つの充分に

調京の範園

1. 2本以上の一本鎖状にフラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーを介して共有結合されており、この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys
Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu

を有し、

そして各フラグメントは：

(a) 転移可能ドメインを含んで成る第一ポリペプチド:

(り) 主鎖可及ドメインを含んで成る群: ポリペプチド; 及び

(c) この第一と第二のポリブタジンを機能的な結合性成分へと選択せしめる

其二のペゾチドリンカー：

を含んで成る、多量の一本鎖状体。

2. 前記輕鐵可變傾斜が下記の距離

Asp	Ile	Val	Met	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Val
Gly	Glu	Lys	Val	The	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Glu	Leu
Tyr	Ser	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Zip	Tyr	Gln	Gln	Lys
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Gly	Ala	Arg
Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr
Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Ser	Val	Lys	Thr	Glu	Asp	Leu	Ala
Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly
Ala	Gly	Thr	Lys	Lys	Val	Leu	Lys							

と実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そして前記細胞可変領域が下記の配列

Glu Val Glu Leu Glu Glu Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Glu Asn Pro Glu Glu Gly Leu
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr

Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
Ser Ser Thr Ala Tyr Val Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp
Gly Glu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸配列を示している、請求項1記載の多肽の一本鎖状体。
5. 前記第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を示す、請求項1記載の多肽の一本鎖状体。

4. 多肽の一本鎖状体をコードする DNA配列であって、この多肽の一本鎖状体
が7本以上の一本鎖状体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが互いに列
すも相和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカ
ーを介して実質的に結合されて成り、そして各フラグメントは：
(a) 懸置可変ドメインを含んで成る第一ペプチド；
(b) 懸置可変ドメインを含んで成る第二ペプチド；及び
(c) この第一と第二のペプチドを機械的な結合部分へと連絡せしめる
第二のペプチドリンカー；
を含んで成る、DNA配列。

5. 前記第一ペプチドをコードする配列が下記の配列：
GAC ATT CTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GCG TCA
CTT GCG CAG AAG CTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC
CTT TCA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCT TCG TAC
CAG CAG AAT CCA GGG CAG TCT CTT AAA CTG CTG ATT TAC TGG
GCA TCC GCT AGC CAA TCT CGG GTC CCT GAT CCG TTC ACA GGC
AGT GGA TCT GGG ACA CAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT CTG
AAG ACT GAA GAC CTG GCA GGT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT
AGC TAT CCC CTC AGC TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG CTG CTG
AAG

と実質的に同じであり、そして前記第二ペプチドをコードする配列が下記の
配列：

GAG GTT CAG TTC CAG CAG TCT GAC GCT CAG TTC CTG AAA CCT
GGG GCT TCA CTG AAG ATT TCC TCC AAG GCT TCT GGC TAC ACC
TTC ACT CAG CAT GCA ATT CAC TCG CTG AAA CAG AAC CTT GAA
CAG GCG CTG GAA TCG ATT CGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT CAT
GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGC TTC AAC GCG AAC GCG ACA CTG
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CCG TAC CTG CAG CTC AAC
AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA CTG TAT TTC TCT ACA AGA
TCC CTG AAT ATG GCG TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA CTC ACC
GTC TCC TCA

と実質的に同じである、請求項1記載の DNA配列。